



Hak Cipta Dilindungi Undang-Undang

1. Dilarang mengutip sebagian atau seluruh karya tulis ini tanpa mencantumkan dan menyebutkan sumber:

- a. Pengutipan hanya untuk kepentingan pendidikan, penelitian, penulisan karya ilmiah, penyusunan laporan, penulisan kritik atau tinjauan suatu masalah.
- b. Pengutipan tidak merugikan kepentingan yang wajar Unand.

2. Dilarang mengumumkan dan memperbanyak sebagian atau seluruh karya tulis ini dalam bentuk apapun tanpa izin Unand.

**ISOLASI DAN KARAKTERISASI BAKTERI PENGHASIL ENZIM
FITASE DARI SUMBER AIR PANAS RIMBO PANTI PASAMAN
SKRIPSI**



**RULI YONIPA SIREGAR
041 62 029**

**FAKULTAS PETERNAKAN
UNIVERSITAS ANDALAS
PADANG 2010**

Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Fitase Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman

Ruli Yonipa Siregar, dibawah bimbingan
Dr. Ir. Neni Gusmanizar, MS dan Prof. Dr. Ir. Yetti Marlinda, MS
Jurusan Nutrisi dan Makanan Ternak Fakultas Peternakan
Universitas Andalas, Padang 2010

ABSTRAK

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan mengkarakterisasi enzim fitase dihasilkan oleh bakteri yang diisolasi dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Industri Pakan dan Mikrobiologi FMIPA. Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga kali ulangan pada setiap perlakuan. Hasil penelitian diperoleh 4 isolat bakteri dan 3 isolat bakteri yang mempunyai kemampuan mendegradasi asam fitat yaitu N1, N3, dan N4. Namun setelah dilakukan skrining isolat N4 mempunyai kemampuan mendegradasi asam fitat dengan aktivitas enzim tertinggi (39.8 mL/mnt).

Bakteri isolat N4 adalah gram-positif, berspora dan berbentuk batang. Selanjutnya isolat N4 ditumbuhkan pada medium cair untuk memproduksi enzim fitase. Enzim fitase yang dihasilkan kemudian dikarakterisasi berdasarkan pH dan temperatur optimum serta stabilitas. Hasil penelitian menunjukkan bahwa enzim fitase yang dihasilkan mempunyai pH optimum 6-7.5, sedangkan temperatur optimum diperoleh 90°C dan temperatur stabilitasnya 30-90°C. Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa enzim fitase yang dihasilkan isolat N4 adalah termostabil yang dapat diaplikasikan pada industri pakan ternak.

Kata kunci: Isolasi; karakterisasi; bakteri; fitase



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur kehadiran Allah SWT, yang dengan limpahan rahmat dan karunia-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul ” **Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Dari Sumber Air Panas Rimbo Panti Pasaman**”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk untuk memperoleh gelar Sarjana Peternakan pada Fakultas Peternakan Universitas Andalas Padang.

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada Ibu Dr. Ir. Neni Gusmanizar, MS , Selaku pembimbing I dan Ibu Prof. Dr. Ir. Yetti Marlida, MS selaku Pembimbing II yang telah banyak membantu, membimbing dan mengarahkan penulis dalam menyelesaikan skripsi ini. Dan tak lupa kepada Ayah dan Ibunda tercinta yang selalu mendo'akan penulis, serta kepada semua pihak yang telah banyak membantu dan memberikan dukungan moril dan materil dalam menyelesaikan laporan ini.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Untuk itu saran dan kritik yang membangun sangat penulis harapkan untuk maksud dan tujuan penelitian ini dapat dicapai. Akhir kata semoga penelitian ini bermanfaat bagi kita semua..

Padang, Mei 2010

Ruli Yonipa Siregar

DAFTAR ISI

	Halaman
KATA PENGANTAR.....	i
DAFTAR ISI.....	ii
DAFTAR TABEL.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vi
DAFTAR LAMPIRAN.....	vii
 I. PENDAHULUAN	
A. Latar Belakang.....	1
B. Perumusan Masalah.....	2
C. Tujuan dan Manfaat Penelitian.....	2
D. Hipotesa Penelitian.....	3
 II. TINJAUAN PUSTAKA	
A. Asam Fitat.....	4
B. Enzim fitase dan Mikroorganisme Penghasil Fitase.....	5
C. Bakteri Termofilik.....	9
D. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim	
1. pH (konsentrasi ion hidrogen).....	10
2. Temperatur.....	11

III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

A. Materi Penelitian

1. Bahan penelitian..... 13
2. Alat-alat penelitian..... 13

B. Metoda Penelitian

1. Rancangan Penelitian.....14
2. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Fitase.....14
3. Penentuan Diameter Zona Bening Bakteri Penghasil Enzim Fitase.....15
4. Identifikasi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase.....16
 - a. Pewarnaan Gram.....16
 - b. Pewarnaan Spora.....16
5. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Tahap II
 - a. Produksi enzim fitase.....17
 - b. Pengukuran Aktivitas Enzim Fitase.....17
 - c. Pengukuran Kadar Protein Kasar Enzim fitase.....18
 - d. Sonicate membran sel bakteri.....18
6. Pengaruh pH, temperatur dan stabilitas terhadap aktifitas enzim fitase
 - a. Penentuan temperatur Optimum.....19
 - b. Penentuan pH optimum terhadap Aktivitas Enzim Fitase.....19
 - c. Pengaruh Temperatur Terhadap Stabilitas Aktivitas Enzim Fitase..20

C. Prosedur Kerja Pembuatan Media dan Reagen

1. Pembuatan medium nutrient agar.....20
2. Medium Seleksi.....20

3. Pembuatan Medium Basal.....	20
4. Pembuatan Reagen Fospat.....	21
5. Pembuatan Bradford Reagen.....	22
D. Waktu dan Tempat Penelitian.....	22

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi Bakteri Penghasil Fitase Tahap I.....	23
B. Identifikasi Morfologi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase.....	24
C. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Tahap II.....	25
D. Pengaruh pH, Temperatur dan Stabilitas Terhadap Aktifitas Enzim Fitase.	
1. pH Optimum Aktivitas enzim Fitase dari Bakteri Isolat 4.....	29
2. Temperatur optimum aktivitas enzim fitase dari isolat 4.....	30
3. Stabilitas enzim aktivitas enzim fitase dari isolat 4.....	32

V. KESIMPULAN DAN SARAN

A. Kesimpulan.....	34
B. Saran.....	34

DAFTAR PUSTAKA.....	35
---------------------	----

LAMPIRAN.....	42
---------------	----

RIWAYAT HIDUP.....	49
--------------------	----

DAFTAR TABEL

Tabel	Teks	Halaman
1.	Jenis Organisme dan Lokasi Penghasil Enzim Fitase.....	8
2.	pH dan Temperatur Optimum dari Jenis Enzim Fitase.....	12
3.	Identifikasi Morfologi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase pada air panas Rimbo Panti Pasaman.....	25



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Teks	Halaman
1. Data Rataan	Aktivitas Enzim Fitase pada pH Yang Berbeda.....	42
2. Data Rataan	Aktivitas Enzim Fitase pada Temperatur Yang Berbeda.....	42
3. Kurva Standar	BSA.....	43
4. Kurva Standar	Fospat	44
5. Data pellet	disonikasi.....	45
6. Data Aktivitas Enzim	Fitase dari isolat N1, N3 dan N4 selama 5 hari	45
7. Data dan Rataan	Stabilitas Aktivitas Enzim Fitase.....	46
8. Foto-foto Pewarnan	Gram dan Pewarnaan Spora Bakteri Isolat N1, N3 dan N4.....	46



1. PENDAHULUAN

A. Latar Belakang

Gandum dan biji-bijian merupakan bahan pakan asal tanaman dimana lebih dari 90% hasil panen dunia merupakan bahan pakan utama bagi ternak monogastrik. Pada umumnya biji-bijian mengandung senyawa fitat (*Myo-inositol Hexakisphospat*) yang dapat mengikat mineral fosfor sehingga tidak dapat dimanfaatkan oleh ternak terutama ternak monogastrik.

Ternak monogastrik seperti babi dan unggas serta ikan tidak mampu mendegradasi senyawa fitat yang mengikat fosfor karena tidak ada enzim fitase pada alat pencernaan menyebabkan rendahnya ketersediaan unsur fospat bagi ternak. Untuk memenuhi kebutuhan fosfor ternak maka kedalam ransum perlu ditambahkan mineral fospat inorganik. Fospat yang tidak dicerna oleh ternak akan dikeluarkan melalui feces sehingga dapat menyebabkan terjadinya pencemaran air sungai, danau, dan tanah. Kelebihan konsentrasi fospat pada lingkungan dapat menyebabkan *eutrophication* yaitu terjadinya pencemaran perairan yang akan menyuburkan alga beracun dan dapat membunuh ikan.

Beberapa peneliti telah mengisolasi thermo fitase dari bakteri dan kapang yang berasal dari luar Indonesia. Jenis kapang penghasil thermoenzim fitase adalah *Aspergillus ficuum* (Ullah, 1988), *Neurospora crassa* (Xiao-Ling *et al.*, 2006). Enzim fitase yang ditemukan pada bakteri seperti *Pseudomonas sp* (Irving dan Cosgrove, 1971), *Bacillus subtilis* (Powar dan Jagannathan, 1982), *Klebsiella sp* (Shah dan Parekh, 1990), *B. subtilis*(natto) (Shimizu, 1992), *Esherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993), *Enterobacter sp* 4 (Yoon *et al.*,

1996) dan *Bacillus* sp (Choi *et al.*, 2001; Kerovuo *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Namun dalam penggunaan enzim ini terkendala pada tidak tahannya enzim fitase terhadap pemanasan selama proses pelleting ransum yang dapat mencapai suhu $>85^{\circ}\text{C}$ (Kirkpinar dan Basmacioglu, 2006). Peningkatan temperatur pada proses pelleting ini dapat mengakibatkan kerusakan aktivitas enzim fitase yang dicampurkan ke dalam ransum.

Untuk mendapatkan enzim yang stabil terhadap suhu tinggi perlu diisolasi mikroorganisme penghasil enzim fitase seperti pada sumber air panas. Oleh karena belum adanya informasi mengenai bakteri termofilik penghasil enzim fitase pada sumber air panas di Rimbo Panti Kabupaten Pasaman Timur Propinsi Sumatra Barat maka dilakukan penelitian untuk mengisolasi dan karakteristik bakteri termofilik lokal baru penghasil enzim fitase yang berasal dari sumber air panas. Selanjutnya diharapkan dapat lebih sesuai digunakan terutama pada industri pakan ternak non-ruminansia.

B. Perumusan Masalah

Permasalahan dalam penelitian ini ialah belum ditemukan adanya mikroorganisme lokal penghasil enzim fitase yang stabil pada pH rendah dan temperatur tinggi sebagai feed aditif.

C. Tujuan dan Manfaat Penelitian

1. Tujuan

Penelitian ini bertujuan untuk mengisolasi dan karakteristik bakteri penghasil enzim fitase baru yang stabil pada temperatur tinggi dari sumber air panas.

2. Manfaat Penelitian

Adapun manfaat penelitian ini adalah memberikan informasi kepada peneliti untuk penelitian selanjutnya dalam memproduksi enzim fitase yang stabil pada temperatur tinggi untuk meningkatkan produksi ternak dan pengembangan industri pakan ternak.

D. Hipotesis Penelitian

Hipotesis Penelitian ini adalah mengisolasi dan karakterisasi bakteri penghasil enzim fitase dari sumber air panas akan memperoleh isolat bakteri penghasil enzim fitase yang tahan terhadap temperatur tinggi dan pH rendah.



II. TINJAUAN PUSTAKA

A. Asam Fitat

Asam fitat (*mio-inositol- 1, 2, 3, 4, 5, 6-heksakisfosfat*) adalah senyawa cadangan utama fosfor pada tanaman yang terikat dalam bentuk asam fitat (Konietzny dan Greiner, 2004 ; Cao *et al.*, 2007). Dan senyawa anti nutrisi didalam biji-bijian, legum dan minyak biji-bijian (Pallauf dan Rimbach, 1996; Martin *et al.*, 2005). Delapan puluh persen kandungan total fospor pada tanaman disimpan dalam bentuk asam fitat (Cao *et al.*, 2007). Asam fitat didalam biji-bijian berfungsi. 1). Sebagai cadangan Fospor, 2). Sebagai simpanan energi ; 3). Sebagai sumber kation ; 4) sebagai sumber *mio-inositol*; 5). Sebagai inisiasi dormasi (Redyy *et al.*, 1989).

Asam fitat dapat berikatan dengan protein pada kisaran pH yang luas membentuk kompleks asam fitat-protein-mineral. Asam fitat mempunyai muatan negatif yang kuat pada pH asam. Pada kondisi ini asam fitat sangat mudah berikatan dengan protein karena titik isoelektrik protein tanaman umumnya pH 4,0-5,0. Pada pH intermediet (pH 6,0-8,0) baik asam fitat maupun protein tanaman mempunyai muatan negatif (Selle *et al.*, 2000).

Ikatan protein tanaman dengan asam fitat menurunkan kelarutan dan daya cerna protein sehingga menurunkan nilai nutrisinya. Komplek asam fitat dengan protein seperti enzim tripsin, pepsin, α -amylase, dan β -galaktosidase juga menyebabkan penurunan aktivitas enzim pencernaan (Sing dan Krikorian, 1982).

Pembentukan kompleks asam fitat pada mineral dalam usus juga dapat menghambat penyerapan mineral seperti Ca, Fe, Zn, dan Mg (Selle *et al.*, 2000) sehingga dapat menurunkan bioavailabilitasnya sangat dipengaruhi oleh asam fitat. Penambahan asam fitat dalam ransum tikus dapat menurunkan bioavailabilitas mineral tersebut (Pallauf dan Rimbach, 1996).

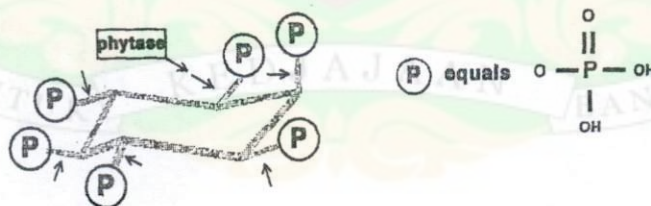
B. Enzim Fitase dan Mikroorganisme Penghasil Fitase

Enzim adalah senyawa organik yang terdiri atas asam amino yang membentuk struktur tiga dimensi yang kompleks yang dihasilkan oleh setiap sel hidup dan berfungsi sebagai biokatalis (Pelczer dan Chan, 1986). Walaupun dalam tubuh ternak enzim dapat diproduksi sendiri sesuai dengan kebutuhan namun penambahan enzim pada ransum kadang kala masih dibutuhkan. Hal ini disebabkan beberapa faktor seperti adanya anti-nutrisi pada bahan pakan rendahnya efisiensi pencernaan bahan pakan dan ketidak tersediaannya enzim tertentu dalam tubuh ternak.

Bahan-bahan pakan yang kaya karbohidrat seperti gandum, barley, jagung, bungkil kedela, dan lainnya mengandung unsur fosfor yang terikat dalam bentuk asam fitat (*myo-inositol hexa dihidrogen phospat*) sehingga ternak tidak dapat memanfaatkan fospat yang berasal dari fitat. Grup fospat yang bermuatan negatif mengikat kuat kation seperti Ca^{+2} , Mg^{+2} , Zn^{+2} , Cu^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} dan K^{+2} membentuk garam-garam yang tidak larut sehingga mempengaruhi pencernaan dan penyerapan mineral ini oleh ternak dan menurunkan ketersediaannya (Gargova *et al.*, 1997). Grup fospat yang terdapat pada fitat dapat juga berintegrasi dengan protein, pati, dan lemak dalam bahan makanan sehingga mempengaruhi kecernaannya oleh ternak unggas.

Fitase adalah salah satu contoh enzim yang digunakan pada ternak monogastrik untuk meningkatkan ketersediaan mineral bagi ternak (Edwards, 1993) dan dapat meningkatkan performan ayam petelur (Van der Klis *et al.*, 1996), karena mineral pada bahan pakan diikat oleh senyawa asam fitat. Rendahnya ketersediaan mineral pada ternak monogastrik dapat diatasi dengan penambahan enzim fitase. Dengan mensuplai fitase dalam ransum ternak akan dapat meningkatkan ketersediaan fosfor, Ca, Zn, dan asam amino bagi ternak. Pemberian enzim fitase pada ternak non-ruminansia dapat dilakukan dalam bentuk tepung atau cairan pasca pelleting (Garrett *et al.*, 2004).

Fitase (*Mio-inosol-heksafosfat fosfohidrolase*) tersebar luas di alam karena bisa ditemukan pada mikroorganisme (kapang, bakteri, dan Ragi), tumbuhan dan beberapa jaringan hewan (Konietzny dan Greiner, 2004 ; Cao *et al.*, 2007). Enzim fitase dapat dibagi dua kategori yaitu 3-fitase (EC.3.1.38) yang berasal dari mikroorganisme dan 6 fitase (EC. 3. 1. 3. 26) berasal dari tanaman (IUPAC-IUB, 1977). Klasifikasi ini berdasarkan pada grup fosfor pertama pada cincin *myo-inositol hexaphosphate* yang diserang oleh enzim. Posisi grup fosfor yang diserang oleh enzim fitase pada asam fitat dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Skema aksi enzim fitase terhadap senyawa fitat.

Enzim fitase yang berasal dari tanaman kurang efektif di dalam usus ternak karena mempunyai spektrum pH yang sempit jika dibandingkan dengan fitase yang berasal dari mikroba (Simons *et al.*, 1990) dan pada pH rendah enzim fitase yang berasal dari tanaman dapat mengalami denaturasi. Stabilitas enzim fitase dari tanaman menurun pada pH dibawah 4 dan diatas 7.5, sedangkan enzim fitase dari mikroba lebih stabil walaupun pada pH diatas 8 dan dibawah 3 (Greiner dan Konietzny, 2006). Selain itu enzim fitase dari tanaman tidak tahan terhadap peningkatan temperatur dan aktifitasnya menurun bahkan hilang selama proses pelleting (Jongbloed and Kemme, 1990).

Beberapa jenis enzim fitase yang berasal dari mikroorganisme tersedia secara komersil yaitu 3-fitase yang berasal dari *Aspergillus niger* dan 6-fitase yang berasal dari *Peniophora lycii* dan *Escherichia coli*. Enzim fitase lebih banyak ditemukan pada kapang, terutama pada jenis *Aspergillus*. Shieh dan Ware (1968) melaporkan lebih dari 2000 mikroorganisme yang diisolasi dari tanah untuk memproduksi enzim fitase. Sebagian besar isolat yang didapat adalah penghasil enzim fitase intraselluler. Enzim fitase yang dihasilkan dari berbagai sumber dapat dilihat pada pada Tabel 1.

Enzim fitase ditemukan pada bakteri seperti *Aerobacter aerogenes* (Greaves *et al.*, 1967), *Pseudomonas sp* (Irving dan Cosgrove, 1971), *Bacillus subtilis* (Powar dan Jagannathan, 1982), *Klebsiella sp* (Shah dan Parekh, 1990), *B. subtilis* (natto) (Shimizu, 1992), *Escherichia coli* (Greiner *et al.*, 1993), *Enterobacter sp 4*. (Yoon *et al.*, 1996) dan *Bacillus sp* DSII (bentuk dari *B. amyloliquefacien*) (Kim *et al.*, 1998a).

Tabel 1. Jenis Organisme dan Lokasi Penghasil Enzim Fitase

Jenis Organisme	Lokasi	Acuan
I. Jenis Kapang		
<i>A. niger</i> NRRL 3135	EX	(Shieh <i>et al.</i> , 1969)
<i>A. flavus</i>	EX	(Shieh dan Ware, 1968)
<i>A. terreus</i>	EX	(Yamada <i>et al.</i> , 1968)
<i>A. carneus</i>	EX	(Ghareib, 1990)
<i>A. oryzae</i>	EX	(Shimizu, 1993)
<i>A. fumigatus</i>	EX	(Pasamaontes, 1997)
<i>Mucor</i> sp	EX	(Shieh dan Ware, 1968)
<i>Penicillium</i> sp	EX	(Shieh dan Ware, 1968)
<i>Penicillium caseolicolum</i>	EX	(Amano Pharmaceutical, 1995)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	IN dan EX	(Sutardi dan Buckle, 1988)
II. Ragi		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EX	(Nayini dan markakis, 1984)
<i>Saccharomyces castelii</i>	EX	(Lambrechts <i>et al.</i> , 1992)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	EX	(Lambrechts <i>et al.</i> , 1992)
<i>Candida tropicalis</i>	EX	(Lambrechts <i>et al.</i> , 1992)
<i>Torulopsis candida</i>	EX	(Lambrechts <i>et al.</i> , 1992)
<i>Debaryomyces castelii</i>	EX	(Lambrechts <i>et al.</i> , 1992)
III. Bakteri		
<i>Bacillus subtilis</i>	EX	(Powar dan jagannathan, 1982)
<i>B. subtilis</i> (natto)	EX	(Shimizu, 1992)
<i>B. amyloliquefacies</i>	EX	(Kim <i>et al.</i> , 1998a, b)
<i>Echerichia coli</i>	IN	(Greiner <i>et al.</i> , 1993)
<i>Klebsiella aerogenes</i>	IN	(Tambe <i>et al.</i> , 1994)
<i>K. terrigena</i>	IN	(Greiner <i>et al.</i> , 1997)
<i>K. oxytoca</i>	IN ^a	(Jareonkitmongkol <i>et al.</i> , 1997)
<i>Pseudomonas</i> sp	EX	(Irving dan Cosgrove, 1971)
<i>Enterobacter</i> sp	EX	(Yoon <i>et al.</i> , 1996)
<i>Citrobacter freundii</i>	IN	(Delucca <i>et al.</i> , 1992)
VI. Tanaman.		
Maize, germinanted	IN	(Laboure <i>et al.</i> , 1993)
Soybaen seed	IN	(Gibson dan Ullah 1988)
Legume seed	IN	(Scott, 1991)
<i>Typha latifolia</i> , pollen	IN	(Hara <i>et al.</i> , 1985)
IV. Binatang	IN	(Yang <i>et al.</i> , 1991a, b)
Tikus, mucosa usus	IN ^b	(Craxton <i>et al.</i> , 1997)
Tikus, dihati	IN ^b	(Freund <i>et al.</i> , 1992)
<i>Paramecium</i>		

EX = extra sellular

IN = intra sellular

^a = periplasmic space

^b = endoplasmic reticulum

C. Bakteri Termofilik

Mikroorganisme yang mampu tumbuh pada suhu diatas 40°C disebut mikroorganisme termofilik. Mikroorganisme ini banyak ditemukan ditempat-tempat tertentu misalnya tanah-tanah selalu terkena sinar matahari, bahan-bahan yang sedang mengalami fermentasi seperti kompos dan di sumber air panas (Brock, 1974).

Bakteri termofilik dapat dibagi menjadi 3 kelompok berdasarkan suhu pertumbuhannya yaitu :

1. Termofilik fakultatif, memiliki suhu maksimal antara 50°C-65°C dan dapat tumbuh dibawah suhu 30°C contohnya *Bacillus coagulan* dan juga *Bacillus stearotherophilus*.
2. Termofilik obligat, tidak dapat tumbuh dibawah suhu 40°C-42°C dan memiliki suhu optimum antara 65°C-70°C. Contohnya kebanyakan dari strain *Bacillus stearotherophilus*.
3. Termofilik Ekstrim, memiliki suhu maksimal diatas 70°C, suhu optimum diatas 65°C dan suhu minimum diatas 40°C contohnya *Thermus thermophilus*, bakteri gram positif yang diisolasi dari sumber air panas mineral Jepang dan *Bacillus caldolyticus* (friedman, 1992).

Secara fisiologis bakteri termofilik memberikan pengaruh untuk mensistensis enzim yang bersifat tahan panas pada suhu tinggi. Bakteri termofilik mempunyai protein yang stabil pada suhu tinggi dan tahan terhadap proses denaturasi dan proteolisis (Kumar and Nussinov, 2001). Selain itu komponen-komponen pembentuk protein seperti ribosom dan struktur pada membran sel bersifat tahan panas hal ini disebabkan karena bakteri termofilik

mempunyai membran yang kandungan lipidnya lebih kaya akan asam lemak jenuh sehingga memungkinkan membran untuk tetap stabil pada suhu tinggi (Friedman, 1992).

Enzim yang diproduksi dari bakteri termofilik tidak hanya mempercepat reaksi pada temperatur yang relevan, tapi bakteri termofilik juga lebih stabil dibandingkan yang lain seperti mesofilik dan psikrofilik. Enzim yang dihasilkan oleh bakteri ini dapat disimpan dalam waktu yang cukup lama dan dapat juga membantu peneliti untuk memanipulasi protein pada kondisi-kondisi eksperimental yang dapat menonaktifkan suatu molekul yang lebih labil. Akhir-akhir ini enzim termostabil banyak digunakan sebagai zat tambahan pada deterjen untuk memproduksi pemanis alami dan digunakan pada pabrik fermentasi (Friedman, 1992).

Aplikasi enzim dalam bioteknologi semakin menuntut enzim yang bersifat tahan lingkungan. Karena faktor yang paling merusak enzim adalah temperatur maka bioteknologi mengarahkan usahanya kedua arah, usaha pertama adalah mencari mikroba penghasil enzim-enzim termofilik dari sumber alam, kedua para ahli bergerak dalam usaha rekayasa enzim yaitu dengan melakukan imobilisasi enzim dan yang lebih canggih lagi dengan rekayasa genetika mikroba penghasil enzim (Suhartono, 1989).

D. Faktor-faktor Yang Mempengaruhi Aktivitas Enzim

1. pH (konsentrasi ion hidrogen)

Konsentrasi ion hidrogen (pH) ialah larutan yang sangat mempengaruhi aktifitas suatu enzim. Setiap enzim mempunyai pH optimum tertentu dimana pada pH tersebut keaktifan enzim paling tinggi. Pengaruh pH terhadap aktivitas

enzim ditentukan oleh beberapa faktor, antara lain denaturasi dari enzim pada pH yang sangat rendah atau pada pH yang sangat tinggi dan pengaruh terhadap keadaan muatan listrik pada substrat enzim. Perubahan pada muatan enzim mempengaruhi aktivitas enzim (Lehninger, 1995).

pH optimum enzim fitase bervariasi dari 2,2- 8,0 (Scott, 1991). Sebagian besar fitase yang dihasilkan oleh mikroorganisme khususnya yang berasal dari kapang mempunyai pH optimum antara 4,5 dan 5,6. Sedangkan enzim fitase yang dihasilkan oleh *A. Fumigatus* mempunyai pH optimum yang luas yaitu 4,0 dan 7,3. Beberapa enzim fitase yang dihasilkan bakteri khususnya yang dihasilkan oleh *Bacillus* mempunyai pH optimum pada pH 6,5-7,5. pH optimum fitase yang dihasilkan dari biji-bijian berkisar dari 4,0-7,5. Dua alkalin fitase yang dihasilkan dari tanaman mempunyai pH sekitar 8,0 (Scott, 1991).

2. Temperatur

Temperatur sangat berperan terhadap aktivitas enzim. Laju reaksi enzim meningkat sampai temperatur optimum kemudian berkurang dengan meningkatnya temperatur diatas temperatur optimum. Pada temperatur dibawah temperatur optimum laju reaksi enzim menurun karena belum semua enzim teraktivasi (Lehninger, 1988). Kebanyakan enzim mempunyai aktivitas optimum pada temperatur antara 30 dan 40°C (Volk dan Wheeler, 1993). Temperatur optimum dari beberapa organisme dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. pH dan Temperatur Optimum dari Jenis Enzim Fitase

Sumber fitase	pH	Temperatur (°C)	Acuan
<i>Aspergillus oryzae</i>	5..5	50	Shimizu (1993)
<i>A. niger</i> NRRL 3135	2.2;	58	Ullah and Gibson (1987)
<i>A. terrus</i>	5.0-5.5	70	Yamada <i>et al.</i> (1968)
<i>A. carneus</i>	4.5	40	Ghareib (1990)
<i>A. carbonarius</i>	5.6	53	Al Asheh and Duvnjak (1994)
<i>Rhizopus oligosporus</i>	4.7	55	Sutardi and Buckle (1988)
<i>Schwanniomyces</i>	4.5	77	Sequeilha <i>et al.</i> (1992)
<i>castelii</i>	4.4	45	AmanoPharmaceuticals
<i>Penicillium caseicolum</i>	3		(1995)
<i>Klebsiella</i> sp.	3	45	Shah and Parekh (1990)
<i>K. terrigena</i>	6	37	Greiner <i>et al.</i> (1997)
<i>Citrobacter freundii</i>	5	58	Delucca <i>et al.</i> (1992)
<i>Escherichia coli</i>	2.7; 5.0	52	Greiner <i>et al.</i> (1993)
<i>Bacillus</i> sp. DS 11	4.5	55	Kim <i>et al.</i> (1998a)
<i>subtilis</i> (natto)	7.5	70	Shimizu (1992)
<i>Typha latifolia</i> , pollen	6.0-6.5	ND	Hara <i>et al.</i> (1985)
Soybean seeds	4.5-4.8	55	Gibson and Ullah (1988)
Legume seeds)	8	ND	Scott (1991)
Maize, germinated	4.8	55	Laboure <i>et al.</i> (1993)
Rat, intestinal mucosa	7.5	7.5	Yang <i>et al.</i> (1991a)

ND = not determined

Kisaran temperatur aktivitas enzim fitase tergantung sumber enzimnya beberapa temperatur optimum enzim fitase dari berbagai mikroba telah dilaporkan. Mikio (1992) mendapatkan temperatur optimum enzim fitase yang berasal dari *B. subtilis* (natto) N-77 adalah 60°C, sedangkan dari *Enterobacter* sp, optimum pada temperatur 50°C. Enzim fitase yang diproduksi oleh *Aspergillus niger* optimum pada temperatur 58°C, *Schwanniomyces castelii* optimum pada temperatur 7,7°C, dan *Klebsiella aerogenes* optimum pada temperatur 45°C. Pandey *et al.* (2001) menambahkan aktivitas enzim fitase dari *Bacillus* sp optimum pada temperatur 55-60 °C.

III. MATERI DAN METODA PENELITIAN

A. Materi penelitian

1. Bahan penelitian

Sampel air panas diambil di sumber air panas Rimbo Panti Kabupaten Pasaman. Sampel diambil secara acak, sampel air dan Lumpur dimasukkan ke dalam botol steril kemudian dibawa ke laboratorium disimpan pada suhu -20°C . Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nutrient agar (NA), Nutrient Broth (NB), Buffer karbonat, buffer acetat, buffer Tris-HCl, Trichlorida acid (TCA), NaOH, spritus, air suling, kapas, tisu, Ekstrak yeast, lugol, safranin, kain kasa, alkohol, kristal violet, soluble starch, asam fitat, kertas whatman no 1, medium seleksi I, medium seleksi II (medium basal), Amonium molibdat, asam askorbat, aluminium foil, NH_4Cl , CaCO_3 , ZnSO_4 , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CoCl_2 , H_2SO_4 .

2. Peralatan Penelitian

Alat-alat gelas, mikropipet, botol universal, jarum ose, batang pengaduk, corong, lampu spritus, timbangan analitik, autoclaf, termometer, inkubator, lemari es, magnet stirer, hot plate, orbital shaker, pH meter, sentrifugar, mikroskop, spektrometer, aluminium foil, penghitung jumlah koloni, vortek, cawan petri, tabung reaksi, gelas piala.

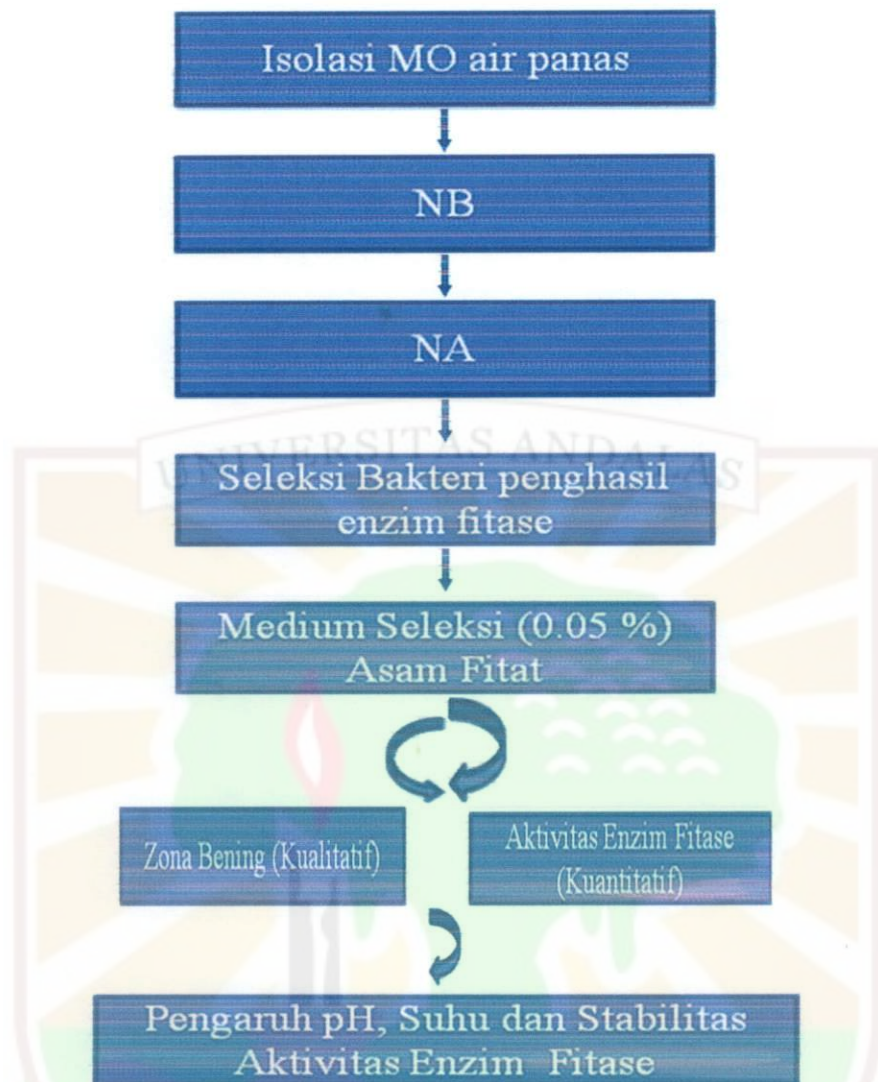
B. Metoda Penelitian

1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan dua tahap yaitu tahap pertama mengisolasi dan menyeleksi bakteri termofilik pengurai asam fitat yang hidup disumber air panas Rimbo Panti Pasaman. Penelitian tahap dua yaitu melakukan produksi enzim fitase dan meneliti pengaruh pH, temperatur dan stabilitas terhadap aktivitas enzim fitase (karakterisasi). Metoda yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode deskriptif dengan tiga kali ulangan pada setiap perlakuan.

2. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Fitase Tahap I

Sampel 100 uL berupa air dan lumpur yang berasal dari Rimbo Panti Pasaman diinokulasi kedalam nutrien broth (NB) dengan pengenceran 10^{-2} air dimasukkan kedalam botol universal yang berisi 10 ml NB, diinkubasi pada temperatur 50°C selama 24 jam. Selanjutnya apabila terdapat kekeruhan dalam NB berarti terjadi pertumbuhan bakteri, jika tidak berarti tidak terdapat bakteri. Kemudian dilakukan pengeceran berseri dan diinokulasi kedalam nutrien agar (NA) dan diinkubasi pada temperatur 50°C selama 48 jam sehingga tumbuh koloni-koloni bakteri. Bakteri yang tumbuh dimurnikan ditumbuhkan pada medium seleksi padat diinkubasi selama 48 jam (Fardiaz, 1989). Isolat-isolat yang tumbuh membentuk zona bening dinyatakan aktif menghasilkan enzim fitase. Isolat-isolat kemudian ditumbuhkan pada NA miring, sebagai stok bakteri Untuk lebih jelasnya dapat lihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Skema Isolasi dan Karakteristik Bakteri Penghasil Enzim Fitase

3. Penentuan Diameter Zona Bening Bakteri Penghasil Enzim Fitase

Penentuan diameter zona bening sesuai dengan metoda Sasramiharja (1998) isolat-isolat murni tersebut diinokulasi pada medium basal diareal petak kurang lebih 2 cm dengan bantuan jarum ose dan diinkubasi selam 24 jam pada suhu 50°C. Apabila bakteri tersebut merupakan galur yang baik diperoleh diameter daerah bening disekitar koloni bakteri.

4. Identifikasi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase

a. Pewarnaan Gram (Fardiaz, 1989)

Kaca objek dibersihkan dari lemak dengan alkohol 96 % kemudian teteskan aquades steril dipermukaan kaca preparat oleskan bakteri, kaca preparat dipanaskan diatas nyala lampu spritus diratakan dan difiksasi setelah dingin warnai dengan kristal violet sebanyak dua tetes selama 1 menit bilas dengan air dan kering-anginkan. Hilangkan warna dengan penambahan alkohol 96 % selama 20 detik bilas dengan air dan dikering-anginkan, warnai kembali dengan lugol selama satu menit bilas dengan air, warnai kembali dengan safranin selama 20 detik bilas dengan air dan kering-anginkan. Hilangkan kelebihan air dengan dikering-anginkan kemudian amati dimikroskop perbesaran 100 X 100 μm . Dari data pengamatan yang didapatkan diperoleh apabila bakteri berwarna merah berarti bakteri negatif dan apabila warna bakteri biru berarti bakteri gram positif. Selanjutnya uji bentuk morfologi bakteri penghasil enzim fitase.

b. Pewarnaan Spora

Dibuat preparat oles, kemudian diberi larutan hijau malakit, dipanaskan preparat selama 5 menit sehingga terlihat uap. Setelah preparat dingin dicuci dengan air yang mengalir, diwarnai dengan safranin selama 1 menit. Dikering-anginkan dengan kertas saring dan diamati (Lay, 1994).

5. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Tahap II

a. Produksi enzim fitase

Dimasukkan 1 % biakan murni dari NB kedalam erlenmeyer yang berukuran satu liter medium seleksi II, kemudian diletakkan pada water bath pada suhu 60 °C, yang sebelumnya dimodifikasi dengan menambahkan pump aquarium kedalam erlenmeyer sehingga terjadi gelembung-gelembung udara diinkubasi selama 96 jam.

Sampel diambil tiap hari untuk diukur aktivitas enzim fitase dan pertumbuhan bakteri (CFU/mL). Enzim diisolasi dengan cara media disentrifuse dengan kecepatan 8000 rpm selama 10 menit, setelah itu ambil supernatan. Selanjutnya dilakukan uji aktivitas enzim fitase.

b. Pengukuran Aktivitas Enzim Fitase (Chen *et al.*, 2005 dimodifikasi)

Kedalam tabung reaksi dimasukkan 100 ul supernatan enzim kasar, 100 ul Na-fitat (1 mM) dan 300 ul buffer Tris pH 7 diinkubasi pada suhu 50 °C selama 30 menit. Kemudian tambahkan 2 ml air dan 2,5 ml reagen (2 volume air, 1 volume 6N asam sulfat, 1 volume 2,5 % amonium molibdat dan 1 volume asam askorbat), kemudian diukur absorban masing-masing sampel pada spektrometer dengan panjang gelombang 630 nm. Pengujian dilakukan dengan tiga kali ulangan pada temperatur 50 °C selama 30 menit. Prosedur yang sama dilakukan untuk larutan standar pospat dan blangko berupa air suling. Standar dibuat dari larutan 10 mM KH_2PO_4 dengan konsentrasi 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 120, 140, 160, 180, 200 μM . Data pengukuran absorban tiap-tiap konsentrasi fospat dapat dilihat pada Lampiran 4.

Pada blangko inaktif enzim diganti buffer lalu ukur aktivitas enzim berdasarkan serapan dengan spektrometer pada panjang gelombang 630 nm (Hayward, 2007). Satu unit aktivitas enzim fitase didefinisikan sebagai jumlah enzim yang dapat menghidrolisis 1 $\mu\text{mol P}_i$ per/mL/ menit berdasarkan kurva standar yang dapat Lampiran 4. Aktivitas enzim diukur dengan rumus dibawah ini.

$$\text{Aktivitas enzim} = \left(\frac{(\text{Absorban} - 0.022)}{0.004} \times 10 \right) : 30 \text{ menit}$$

c. Pengukuran Kadar Protein Kasar Enzim fitase

Pengukuran enzim kasar dilakukan menurut metoda Bradford (1976). Kadar protein terlarut ditentukan dengan kalibrasi kurva standar bovin serum albumin (BSA) dengan kosentrasi 0, 6.25, 1.25, 1.85, 2.5, 3.125, 3.75, 4.375, 5 mg/ml data pengukuran absorban tiap-tiap kosentrasi BSA dapat dilihat pada Lampiran 3.

d. Sonicate membran sel bakteri

Mensonikasi membran sel bakteri dalam penelitian ini bertujuan untuk menentukan enzim yang diperoleh apakah enzim ekstraseluler atau intraseluler. Hal ini berdasarkan pada hasil penelitian dimana tiap-tiap isolat diuji aktivitas enzimnya. Dalam pengujian aktivitas enzim fitase pada tiap-tiap isolat terdapat aktivitas namun pada waktu pengukuran kadar protein enzim kasar tidak ditemukan protein yang dikeluarkan oleh tiap-tiap isolat. Untuk itu penelitian ini mencoba melakukan sonifikasi pellet pada salah satu isolat yaitu isolat N 4.

Mensonikasi membran sel bakteri diperoleh dari produksi enzim fitase dimana pellet dari produksi ini diambil selanjutnya pellet dicuci dengan buffer

Tris-HCl 50 uM pH 7 sebanyak dua kali kemudian disentrifuse dibuang supernatannya, setelah itu pellet dicuci lagi dengan buffer Tris-HCl sebanyak dua kali, pencucian ini bertujuan untuk menghilangkan nutrien-nutrien yang terikat pada membran yang akan mempengaruhi pengukuran aktivitas enzim fitase (Gusmanizar, 2004). Setelah itu pellet disonikasi selama 15 menit kemudian disentrifuse untuk dipisahkan antara pellet dengan supernatan setelah itu baru diukur aktivitas enzim fitase pada pellet dan supernatan.

6. Pengaruh pH, temperatur dan stabilitas terhadap aktifitas enzim fitase

a. Penentuan temperatur Optimum (Chen *et al.*, 2005 dimodifikasi)

Penentuan temperatur optimum untuk pengukuran aktivitas enzim fitase dilakukan dengan mencampurkan enzim fitase sebanyak 100 ul, 300 ul Tris-buffer pH optimum yang didapat sebelumnya, enzim direaksikan dengan substrat yaitu Na-fitat dengan konsentrasi fitat 1 mM sebanyak 100 ul. Campuran reaksi diinkubasi pada temperatur berbeda selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 2 mL aquades dan 2,5 mL reagen fosfat diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah itu diukur fosfat yang dibebaskan menggunakan spektrometer pada panjang gelombang 630 nm (Hayward, 2007). Sebagai blanko digunakan buffer Tris-HCl untuk pengganti inaktif-enzim.

b. Penentuan pH optimum terhadap Aktivitas Enzim Fitase (Chen *et al.*, 2005 dimodifikasi)

Penentuan pH optimum untuk pengukuran aktivitas enzim fitase dilakukan dengan mencampurkan enzim fitase sebanyak 100 ul, 300 ul buffer yang berbeda, enzim direaksikan dengan dengan substrat yaitu asam fitat dengan konsentrasi fitat 1 mM sebanyak 100 ul campuran reaksi diinkubasi

pada temperatur 50°C selama 30 menit. Kemudian ditambahkan 2 ml aquades dan 2,5 reagen phospat diinkubasi pada temperatur 50°C selama 30 menit. Setelah itu diukur phospat yang dibebaskan menggunakan spektrometer pada panjang gelombang 630 nm (Hayward, 2007). Sebagai blangko digunakan buffer Tris-HCl untuk pengganti inaktif-enzim.

c. Pengaruh Temperatur Terhadap Stabilitas Aktivitas Enzim Fitase (Chen *et al.*, 2005 dimodifikasi)

Pengujian stabilitas temperatur enzim fitase dilakukan dengan menggunakan 1 ml enzim dalam test tube pada temperatur yang berbeda yaitu 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100°C, diinkubasi selama satu jam, kemudian diukur aktivitas enzim fitase seperti prosedur diatas. Sebagai blangko digunakan buffer Tris-HCl untuk pengganti inaktif-enzim.

C. Prosedur Kerja Pembuatan Medium dan Reagen

1. Pembuatan medium nutrient agar

Ambil sebanyak 23 gram NA powder dilarutkan 1000 ml aquades dihomogenkan dengan magnetic stirrer dan dimasukkan kedalam tabung reaksi kemudian diautoclaf pada suhu 121°C tekanan 15 lbs selama 15-20 menit.

2. Medium Seleksi I

Formulasi medium untuk menseleksi bakteri penghasil fitase adalah modifikasi dari Gulati *et al.* (2007) mengandung (g/L): 1% glukosa, 0.5% NH_4NO_3 , 0.05% KCl, 0.05% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001% $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05%, Na-phytat, 2.0% agar, dibuat pada pH 5.5.

3. Medium seleksi II (Medium basal)

Pada penelitian ini digunakan basal medium modifikasi dari Lan *et al.* (2002) mengandung (g/L): 10 gram glukosa, 4 gram soluble starch, 10 gram trypticase pepton, 4 g Yeast extract, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 2 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ dan 10 mL trace element pH 5.5 Komposisi trace element adalah (g/L): 0.003 g $\text{CoCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g H_3BO_3 , and 0.002 g $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Gusmanizar, 2004). Kultur diinkubasi selama 2 hari pada suhu 50 °C (Elsorra *et al.*, 2002).

Glukosa diautoklaf terpisah dengan bahan lain untuk menghindari terjadinya reaksi pembentukan warna coklat. Sedangkan strelisasi Na-phytat dilakukan dengan menggunakan 0.45 μm polytetrafluoroethylene (PTFE) filter untuk menghindari terjadinya proses degradasi oleh pemanasan (Gusmanizar, 2004). Medium seleksi II diatas dimasukan kedalam tiap-tiap botol universal sebanyak 15 ml dan pH medium disesuaikan jadi 5,5 menggunakan 0,5 M HCl. Kedalam medium di tambahkan 0.05 % Na-Fitat.

4. Pembuatan Reagen Fospat

Reagen fospat terdiri dari 10 % asam askorbat (10 gram dalam 100 ml aquades), 2.5 % amonium molibdat (2.5 gram dalam 100 ml aquades) dan 6 N asam sulfat (18 ml dalam 108 ml aquades) kemudian komposisi diatas dicampurkan menjadi satu bagian dengan perbandingan 2 bagian aquades, 1 bagian asam sulfat, 1 bagian amonium molibdat dan 1 bagian untuk asam askorbat.

5. Pembuatan Bradford Reagen

Bradford reagen yang mengandung (/L) 100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 dalam 50 ml 95 % ethanol, kemudian ditambahkan 100 ml 85% (v/v) H_2PO_4 , lalu volume dijadikan 1 liter dengan penambahan air suling. Reagen ini dimasukkan pada botol yang berwarna coklat diletakkan pada suhu kamar dan dapat disimpan selama satu bulan.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

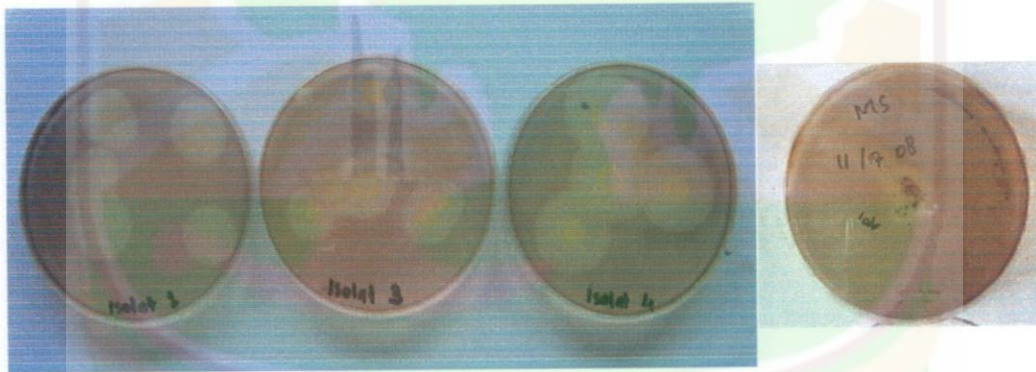
Penelitian ini dilakukan mulai dari bulan Mei 2008 sampai September 2008, dilaboratorium Teknologi Industri Pakan Fakultas Peternakan dan di laboratorium Mikrobiologi FMIPA Universitas Andalas Padang.



IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

A. Isolasi dan Seleksi Bakteri Penghasil Fitase Tahap I

Hasil isolasi terhadap bakteri sumber air panas Rimbo Panti Pasaman ini diperoleh empat isolat (isolat N1, N2, N3 dan N4) dari keempat isolat ini hanya tiga yang menghasilkan enzim fitase yang ditunjukkan dengan adanya zona bening disekitar koloni (Gambar 3) yaitu isolat N1, N3 dan N4. Adanya zona bening disekeliling koloni karena terjadinya hidrolisis asam fitat menjadi fosfor oleh enzim fitase ekstraseluler yang dihasilkan yang berdifusi kedalam medium. Menurut Selle *et al.* (2006) menyatakan bahwa mikroorganisme yang menghasilkan enzim fitase ekstraseluler mampu menghidrolisis asam fitat menjadi fosfor sehingga wilayah disekitar lingkungan koloni terlihat bening.



Gambar 3. Isolat-isolat bakteri penghasil enzim fitase yang terlihat sebagai zona bening.S

Keterangan : N1 = luas zona beningnya 0.7 cm
N3 = luas zona beningnya 0.6 cm
N4 = luas zona beningnya 1 cm

Adanya perbedaan antara isolat-isolat rimbo panti dalam menghasilkan enzim fitase ekstraseluler disebabkan karena adanya perbedaan jenis isolat bakteri tersebut dan kemampuannya dalam menghasilkan enzim juga berbeda-beda. Hal ini sesuai dengan pendapat Fardiaz (1989) menyatakan bahwa mikroorganisme berbeda kemampuannya dalam menghasilkan baik metabolisme sekunder maupun primer seperti enzim.

Isolat N2 ditemukan tidak membentuk zona bening disebabkan karena isolat ini tidak menghasilkan enzim fitase dan terlihat dari pertumbuhan koloni yang kecil serta tidak berkembang dengan baik.

B. Identifikasi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase

Identifikasi morfologi bakteri meliputi pengamatan secara makroskopis bentuk bakteri sedangkan mikroskopis untuk melihat bentuk sel bakteri. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Tabel 3, dan Gambar bentuk bakteri dan sel bakteri dapat dilihat pada Lampiran 8.

Dari hasil penelitian didapat bahwa bakteri isolat N1 dan N3 merupakan bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah yang terlihat dibawah mikroskop setelah melakukan perwarnaan gram, sel berbentuk batang dan tidak memiliki spora. Sedangkan bakteri isolat N4 merupakan bakteri gram-positif yang ditandai dengan berwarna lembayung/biru terlihat dibawah mikroskop setelah melakukan perwarnaan gram, sel berbentuk batang dan memiliki spora.

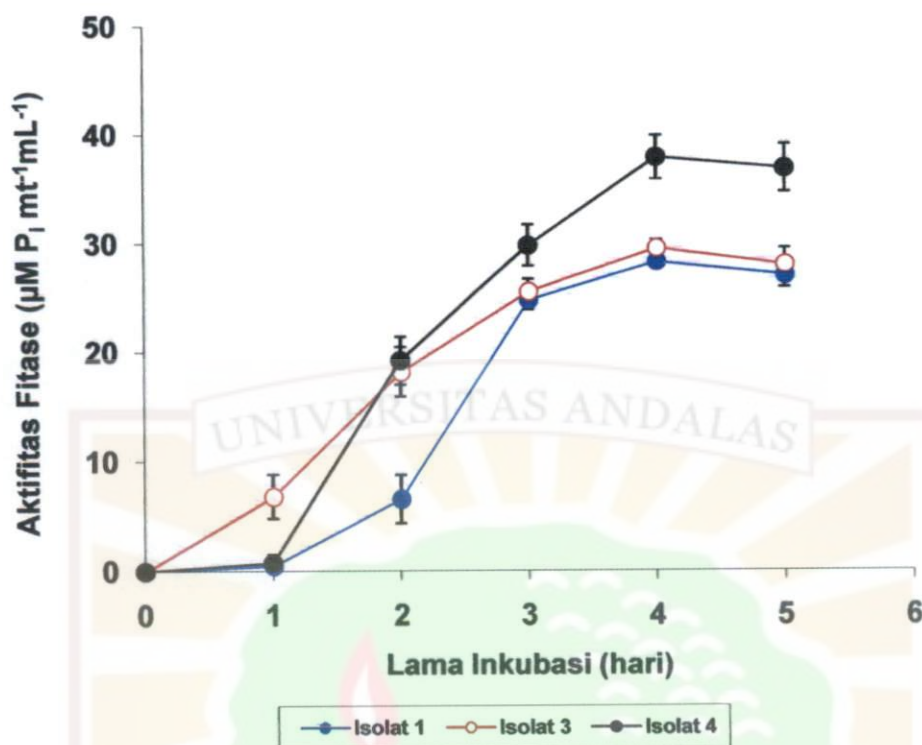
Tabel 3. Identifikasi Morfologi Bakteri Isolat Penghasil Enzim Fitase pada air panas Rimbo Panti Pasaman

Kode isolat	Makroskopis				Mikroskopis		
	Warna	Bentuk koloni	Permukaan koloni	Pinggir koloni	gram	Bentuk sel	spora
N1	Putih susu	bulat	cembung	Bergelombang	negatif	batang	Tidak
N3	Putih susu	bulat	Rata	Bergelombang	negatif	batang	tidak
N4	Putih susu	bulat	cembung	Bergelombang	positif	batang	Berspora

Menurut Buchana dan Gibsons (1974) menyatakan bahwa semua jenis *Bacillus* termasuk bakteri gram positif berbentuk batang, mempunyai endospora yang tahan panas, beberapa species membentuk gas, menghasilkan enzim katalase, bergerak dengan flagella, mampu memetabolisme pati.

C. Seleksi Bakteri Penghasil Enzim Fitase Tahap II

Isolat bakteri N1, N3, dan N4 yang diperoleh dari seleksi tahap I, dilanjutkan untuk seleksi tahap dua menggunakan medium cair (medium seleksi II). Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa isolat N4 mempunyai aktivitas enzim fitase yang lebih tinggi jika dibandingkan dengan isolat N1 dan N3. Hasil yang diperoleh dapat dilihat pada Gambar 4, dan data pengukuran absorban tiap-tiap isolat dapat dilihat pada Lampiran 6.



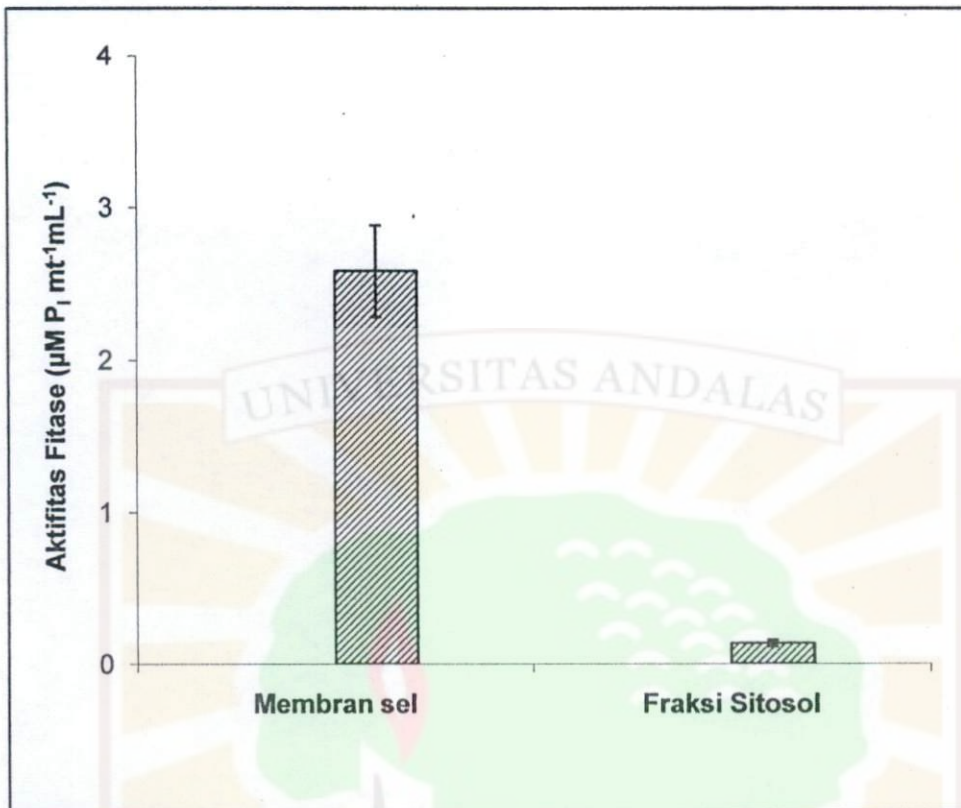
Gambar 4. Aktivitas enzim fitase isolat N1, N3 dan N4 pada medium basal yang mengandung Na-fitat sebagai induser.

Aktivitas enzim fitase paling tinggi diperoleh setelah 4 hari inkubasi dan menurun pada hari ke 5. Hal ini disebabkan karena substrat sudah berkurang setelah didegradasi oleh bakteri dan fosfat yang dibebaskan digunakan untuk pertumbuhannya. Hasil yang sama juga diperoleh oleh Lan *et al.* (2002) yang menginkubasi bakteri *Mitsuokella jalaludinii* selama 4 hari untuk menghasilkan enzim fitase. Pada Gambar 4, terlihat bahwa aktivitas enzim fitase yang dihasilkan isolat N1 adalah 29.27 $\mu\text{M P}_i/\text{mL}/\text{menit}$; isolat N3 dan N4 dengan aktivitas masing-masing berturut-turut adalah 30.6 $\mu\text{M P}_i/\text{mL}/\text{menit}$ dan 39.8 $\mu\text{M P}_i/\text{mL}/\text{menit}$. Dari Gambar 4 terlihat bahwa aktivitas tertinggi dihasilkan oleh

isolat N4, sehingga untuk memproduksi dan karakterisasi enzim dilanjutkan menggunakan isolat N4. Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa isolat yang berbeda bila ditumbuhkan pada medium yang sama akan menghasilkan kemampuan memproduksi fitase berbeda. Hal ini disebabkan oleh jenis bakteri yang diuji juga berbeda. Hal yang sama juga dilaporkan oleh (Delfita, 2008) menyatakan kapang endopitik yang diisolasi dari dalam tanaman kedelai dengan isolat berbeda dan ditumbuhkan pada medium yang sama menghasilkan kemampuan menghasilkan fitase berbeda.

Penentuan kemampuan isolat N4 bersifat ekstraseluler atau intraseluler selanjutnya dilakukan dengan sonifikasi/menglisis sel membran dari bakteri N4, kemudian diuji aktivitas enzim fitasenya. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 5, dan data pengukuran absorban membran sel dan fraksi sitosol dapat dilihat pada Lampiran 5.





Gambar 5. Perbandingan antara fraksi sitosol dengan enzim membran

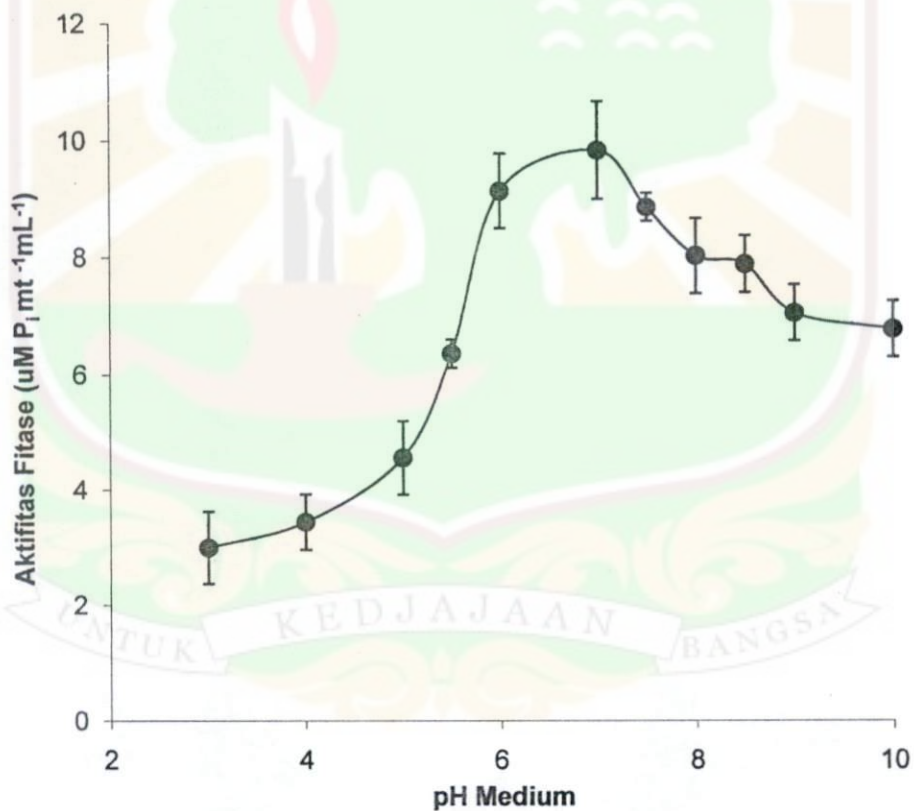
Pada Gambar 5, terlihat bahwa aktivitas enzim fitase pada membran lebih besar dari pada sitosol (pada membran sel = $0.6 \mu\text{MP}_i \text{ mnt/ml}$, dan fraksi sitosol = $-1.3 \mu\text{MP}_i \text{ mnt/ml}$). Enzim fitase yang dihasilkan adalah enzim fitase yang terikat dalam membran. Hal yang sama dilaporkan Yanke *et al.* (1998) menyatakan bahwa sel bakteri dari *S. ruminantium* JY35 setelah disonikasi menghasilkan aktivitas enzim fitase yang berbeda antara fraksi sitosol dengan membran sel, aktivitas enzim fitase terukur pada membran sebesar 72 % (1.67 U) dan fraksi sitosol sebesar 2 % (0.05 U). Ini berarti enzim yang dihasilkan dari *S. ruminantium* JY35 adalah enzim yang terikat dimembran

D. Pengaruh pH, Temperatur dan stabilitas terhadap aktifitas enzim fitase.

Pengaruh pH, temperatur dan stabilitas temperatur terhadap aktivitas enzim fitase diketahui melalui penentuan kondisi optimum untuk pengukuran aktivitas enzim fitase dari isolat N4. Penelitian ini dilakukan dengan mengoptimasi pH buffer dan temperatur inkubasi.

1. Pengaruh pH terhadap aktivitas enzim fitase

Kemampuan enzim dalam menghidrolis substrat diamati pada berbagai pH dengan memvariasikan pH dari larutan buffer mulai dari pH 3-10. Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 6, dan data pengukuran absorbansi tiap-tiap pH dapat dilihat pada Lampiran 1.



Gambar 6. pH Aktivitas Enzim Fitase yang Dihasilkan oleh Isolat N 4 diisolasi dari Rimbo Panti Pasaman.

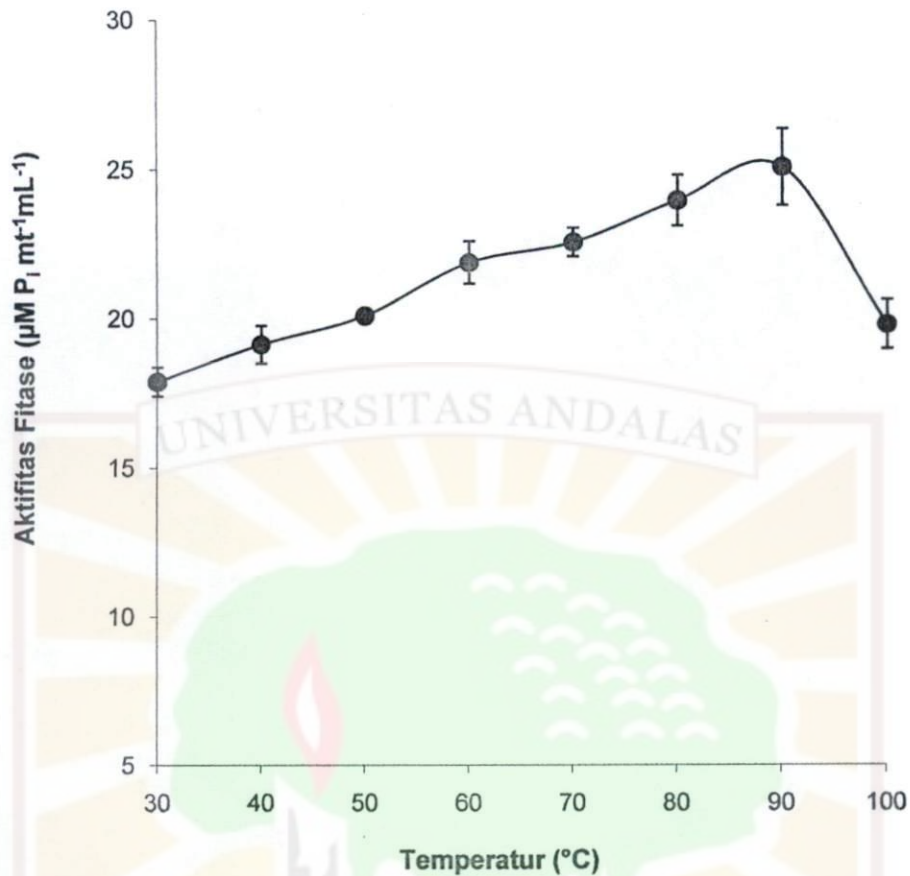
Dari Gambar 6, dapat dilihat bahwa pH optimum aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 adalah 6-7.5 . Menurut Wang *et al.* (1979) bahwa pH sangat berpengaruh terhadap reaksi enzimatik dimana perubahan pH berakibat langsung terhadap gugus ionik enzim, sehingga mempengaruhi bagian aktif dan konformasi enzim. Pada pH optimum aktivitas kerja enzim tersebut juga maksimum.

Pada pH dibawah dan diatas 6-7.5 didapatkan aktivitas enzim fitase menurun. Menurut Lehninger (1988) menyatakan bahwa pada pH yang rendah enzim akan terprotonasi dan kehilangan muatan negatifnya yang selanjutnya akan mempengaruhi pada ikatan kompleks enzim substrat dan pada akhirnya memberikan pengaruh yang berarti dalam menentukan aktivitas enzim. Sedangkan pada pH yang tinggi enzim akan terionisasi dengan kehilangan muatan positifnya. Selain itu perubahan pH yang terlalu besar diatas dan dibawah pH optimum menyebabkan terjadinya denaturasi protein enzim.

pH optimum dalam penelitian ini adalah 6-7.5, dimana nilai ini hampir sama dengan yang didapat Scott (1991) menyatakan bahwa beberapa enzim fitase yang dihasilkan bakteri khususnya yang dihasilkan oleh *Bacillus* mempunyai pH optimum pada pH 6,5-7,5.

2. Pengaruh Temperatur terhadap aktivitas enzim fitase

Temperatur optimum aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 ditentukan pada kondisi pH optimum (7) . Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 7, dan data pengukuran absorban tiap-tiap temperatur dapat dilihat pada Lampiran 2.



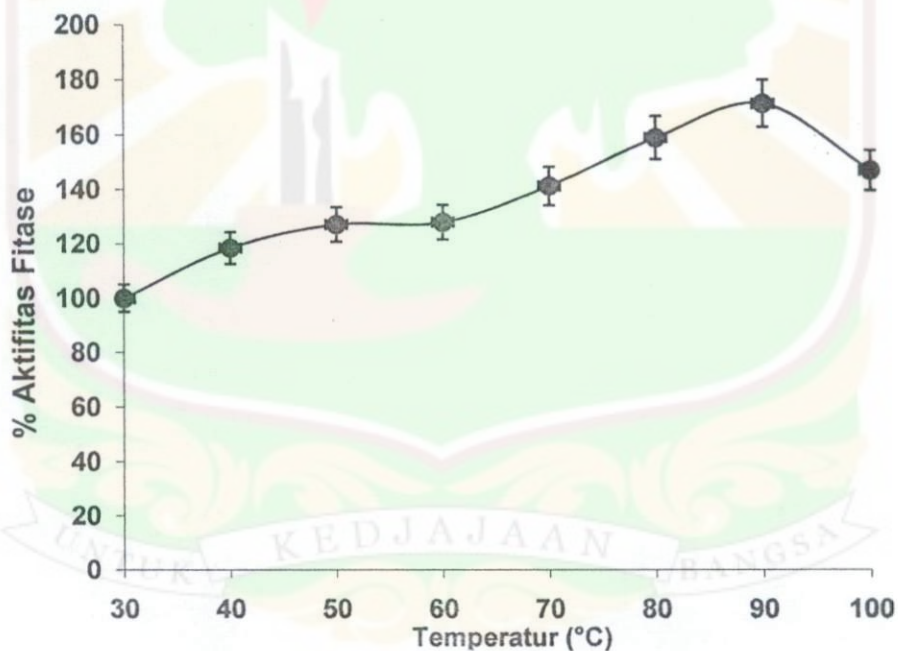
Gambar 7. Temperatur aktivitas enzim fitase yang dihasilkan oleh isolat N4 diisolasi dari Rimbo Panti Pasaman

Dari Gambar 7, dapat dilihat bahwa temperatur optimum aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 adalah 90°C. Pada temperatur dibawah dan diatas 90°C didapatkan nilai aktivitas enzim menurun. Turunnya aktivitas dibawah suhu optimum disebabkan belum semua enzim teraktivasi. Sedangkan penurunan aktivitas enzim fitase diatas suhu optimum adalah karena enzim mengalami denaturasi (Lehninger, 1988).

Beberapa penelitian mengenai enzim fitase yang dihasilkan bakteri, khususnya yang dihasilkan oleh *Bacillus* sp mempunyai temperatur optimum aktivitas enzim fitase adalah 55-60°C (Pandey *et al.*, 2001). sedangkan aktifitas enzim fitase yang berasal dari *B. Amyloliquefaciens* optimum pada temperatur 70°C (Kim *et al.*, 1998).

3. Stabilitas Temperatur aktivitas enzim fitase

Stabilitas temperatur aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 ditentukan pada kondisi pH optimum (7). Hasilnya dapat dilihat pada Gambar 8, dan data pengukuran absorbansi tiap-tiap temperatur dapat dilihat pada Lampiran 7. Hasil yang diperoleh menunjukkan bahwa stabilitas temperatur aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 adalah 30-90°C.



Gambar 8. Temperatur Stabilitas aktivitas enzim fitase yang dihasilkan oleh isolat N4 diisolasi dari rimbo panti.

Stabilitas aktivitas enzim fitase meningkat dengan meningkatnya temperatur. Pada temperatur 30 s/d 90°C yang diinkubasi selama satu jam, aktivitas enzim fitase meningkat 71%. Stabilitas aktivitas enzim fitase tertinggi diperoleh pada temperatur 90°C dan pada temperatur 100°C aktivitasnya enzim fitase mengalami menurun sebanyak 24.4 %. Aktivitas enzim fitase dari bakteri isolat N4 stabil pada temperatur 30-90°C, Hasil ini lebih tinggi dari penelitian tentang mikroorganisme penghasil enzim fitase yang stabil pada temperatur 45-60°C (Lei *et al.*, 2003). Kim *et al.* (1998a) melaporkan bahwa *Bacillus* sp. strain DS1 stabil pada temperatur 70°C yang diinkubasi selama 10 menit dengan menambahkan mineral CaCl_2 . Choi *et al.* (2001) melaporkan enzim fitase yang berasal dari *Bacillus* sp KHU – 10 stabil pada temperatur 40°C.



V. KESIMPULAN

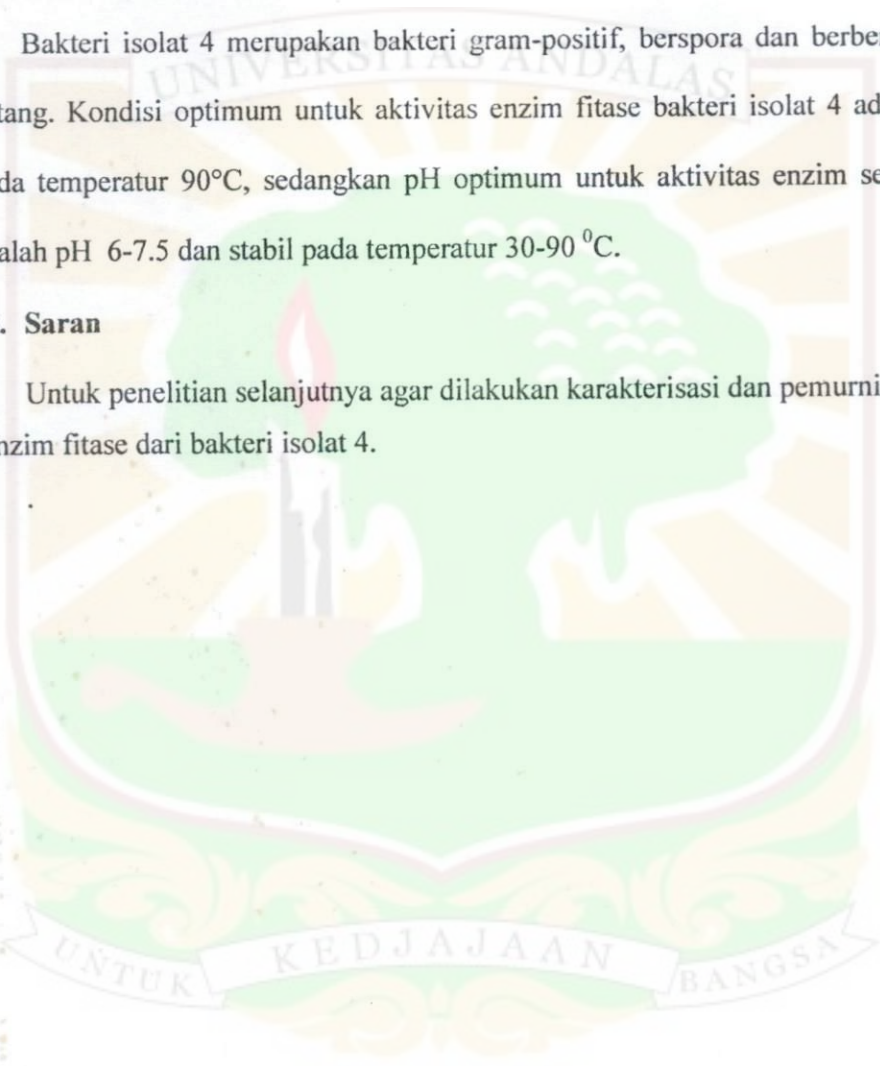
A. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa dari keempat isolat yang didapat dari isolasi bakteri penghasil enzim fitase berasal dari sumber air panas Rimbo Panti Pasaman, bakteri isolat 4 merupakan isolat terbaik yang memiliki aktivitas enzim tertinggi.

Bakteri isolat 4 merupakan bakteri gram-positif, berspora dan berbentuk batang. Kondisi optimum untuk aktivitas enzim fitase bakteri isolat 4 adalah pada temperatur 90°C, sedangkan pH optimum untuk aktivitas enzim sesuai adalah pH 6-7.5 dan stabil pada temperatur 30-90 °C.

B. Saran

Untuk penelitian selanjutnya agar dilakukan karakterisasi dan pemurnian enzim fitase dari bakteri isolat 4.



DAFTAR PUSTAKA

- Amano, P. 1995. Novel Phytase. Japan Pat. 07067635.
- Al Asheh, S. and Z. Duvnjak. 1994. Characteristics of phytase produced by *Aspergillus carbonarius* NRC 401121 in canola meal. *Acta Biotechnology* 14 : 223-233..
- Brock, T. D. 1974. *Biology of Microorganism*. 2nd. Ed. Prentice Hall, Inc Englewood clift, New Jersey.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
- Buchana, R. E. and N. E. Gibsons. 1974. *Bergeys manual of determinative bacteriology*. The Williams and Walkins Company, Baltimore.
- Cao, L., W. Wang, C. Yang, J. Diana, A. Yakupitiyage, Z. Luo, and D. Li. 2007. Application of Microbial Phytase in Fish Feed. *Journal of Enzyme and Microbial Tecnology* 40: 497-507.
- Choi, Y. M., H. J Suh, and J. M Kim. 2001. Purification and properties of extracellular phytase from *Bacillus* sp. KHU-10. *Journal of Protein Chemistry* 20: 287-292.
- Chen, M. Dunham and C. Christianson. 2005. Phosphate Assay. [http // www. Genomics. Priceton.edu/duham .com](http://www.Genomics.Priceton.edu/duham.com). diakses pada tanggal 10 Desember 2008. 14.00 WIB.
- Craxton, A., J. J. Caffrey, W. Burkhart, S. T. Safrany, and S. B. Shears. 1997. Molecular cloning and expression of a rat hepatic multiple inositol polyphosphate phosphatase. *Biochemistry Journal* 328 : 75-81.
- Delucca, A. J., C. Dischinger and A. H. J. Ullah. 1992. Identification of a phytase from *Citrobacter freundii*. Abstrac. Gen. Meeting. American. Society force. Microbiology. 92 Meet. 385.
- Delfita, R. 2008. Isolasi dan karakteristik mikroflora endofitik penghasil enzim fitase dari tanaman kedelai. Tesis Pascasarjana Universitas Andalas, Padang.
- Edwards, H. M. JR. 1993. Dietary 1, 25-dihydroxycholecalciferol supplementation increases natural phytate phosphorus utilization in chickens. *Journal of Nutrition* 123: 567-573.

- Elsorra E. Idriss., M. Oliwia, F. Abdelazim, R. Kristin, G. Ralf, B. Helmut, R. Thomas, and B. Rainer. 2002. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology* 148: 2097–2109.
- Fardiaz, S. 1989. Penuntun praktikum mikrobiologi pangan. Penerbit IPB, Bogor.
- Friedman, S. M. 1992. Termofilik Microorganisme. In *Encyclopedia of Mikrobiologi*. Hunter College of city University of New York. By academic Press. Inc. New York.
- Freund, W. D., G. Mayr, W. Tielz, dan J. E. Schultz. 1992. Metabolic of inosol phosphate in the protozoan, paramecium. *Europe Journal of Biochemistry*. 207 : 359-367.
- Gargova, S., Z. Roshkova, and G. Vancheva. 1997. Screening of fungi for phytase Production. *Biotechnology Techniques* 11(4):221–224.
- Garrett, J.B., K. A. Kretz, E. O. Donoghue, J. Kerovuo, W. Kim, N. R. Barton, G. P. Hazlewood, J. M. Short, D. E. Robertson, and K. A. Gray. 2004. Enhancing the thermal tolerance and gastric performance of a microbial phytase for use as a phosphate-mobilizing monogastric-feed supplement. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3041–3046.
- Gibson, D. M. and A. H. J. Ullah. 1988. Purification and characterization of phytase from cotyledons of germinating soybean seeds. *Archives and Biochemistry Biophysics* 260: 503-513.
- Ghareib, M. 1990. Biosynthesis, purification, and some properties of extracellular phytase from *Aspergillus carneus*. *Acta Microbiology Hung* 37 : 412-418.
- Greaves, M. P., G. Anderson, and D. M. Webley. 1967. The hydrolysis of inositol phosphates by *Aerobacter aerogenes*. *Biochim. Biophys. Acta* 132 : 412-418.
- Greiner, R., U. Konietzny, and K. D. Jany. 1993. Purification and characterization of two phytases from *Escherichia coli*. *Archives Biochemistry and Biophysics* 303: 107-113.
- Greiner, R., E. Haller, U. Konietzny, and K. D. Jany. 1997. Purification and characterization of a phytase from *Klebsiella terrigena*. *Archives Biochemistry and Biophysics* 341: 201-206.
- Greiner, R. and U. Konietzny. 2006. Phytase for food application. *Food Tecnology and Biotechnology* 44: 201-206.

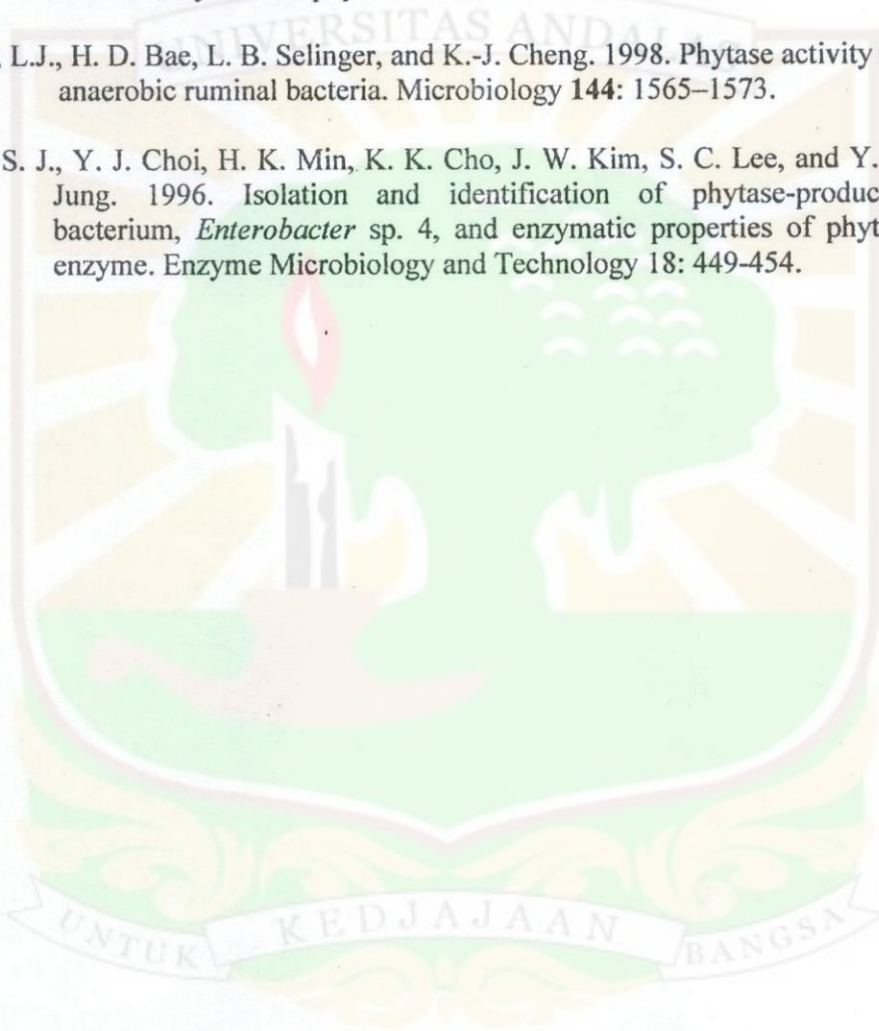
- Gulati, H.K., B. S. Chadha, and H.S. Saini. 2007. Production of feed enzyme (phytase and plant cell wall hydrolyzing enzyme) by *Mucor indicus* MTCC 6333: Purification and characterization of phytase. *Folia microbiologica* 52 (5):491-497.
- Gusmanizar, N., J. Suriani, Z. Asrah, M. A. Syed, J. Ramli, and M.Y. Shukor. 2004. Screening and isolation of *acrylamide*-degrading bacteria from Malaysian soils. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 9: 73.
- Hara, A., S. Ebina, A. Kondo, and T. Funaguma. 1985. A new type of phytase from pollen of *Typha latifolia* L. *Agriculture. Biological Chemistry* 49: 3539-3544.
- Hayward, C.A. 2007. Phosphate Assay Kit. [http // www.bioassaysys.com](http://www.bioassaysys.com) diakses pada tanggal 28 Januari 2009. 19.00 WIB.
- Irving, G. C. J. and D. J. Cosgrove. 1971. Inositol phosphate phosphatase of microbial origin. Observations on the nature of the active center of a bacterial (*Pseudomonas* sp.) phytase. *Australian Journal Biological Science* 24 : 1559-1564.
- IUPAC-IUB (Commission on Biochemical Nomenclature). 1977. Nomenclature of phosphorus containing compounds of biochemical importance. *Eur. Journal Biochemistry* 79 : 1-9.
- Jareonkitmongol, S., M. Ohya, R. Watanabe, H. Takagi, and S. Nakamori. 1997. Partial purification of phytase from a soil isolate bacterium, *Klebsiella oxytoca* MO-3. *Journal Fermentation and Bioengineering* 83: 393-394.
- Jongbloed, A. W. and P. A. Kemme. 1990. Effect of pelleting mixed feeds on phytase activity and the apparent absorbability of phosphorus and calcium in pigs. *Animal Feed Science and Technology* 28: 233-242.
- Kerovuo, J.; M. Lauraeus, P. Nurminen, N. Kalkinen, and J. Apajalahti. 1998. Isolation, characterization, molecular gene cloning and sequencing of a novel phytase from *Bacillus subtilis*. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 2079-2085.
- Kim, Y. O., M. J Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998a. Purification and properties of a thermostable phytase from *Bacillus* sp. DS11. *Enzyme and Microbial Technology* 22: 2-7.
- Kim, Y. O., M. J Kim, K. S. Bae, J. H. Yu, and T. K. Oh. 1998b. Cloning of the thermostable phytase gene (phy) from *Bacillus* sp. DSI 1 and its overexpression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letter* 162 : 185-191.

- Kırkpınar, F. and H. Basmacıoğlu. 2006. Effects of pelleting temperature of phytase supplemented broiler feed on tibia mineralization, calcium and phosphorus content of serum and performance. *Czech Journal of Animal Science* 51 (2): 78–84.
- Konietzny, U. and R. Greiner. 2004. Bacterial Phytase : Potential application, *in Vivo* function and regulation of Its Synthesis. *Brazilian Journal of Microbiology* 35 : 11-18.
- Kumar, S., R. Nussinov. 2001. How do thermophilic proteins deal with heat ?. A review. *Cell. Mol. Life Sci.* 58, 1216-1233.
- Laboure, A. M., J. Gagnon, and A. M. Lescure. 1993. Purification and characterization of a phytase (*myo*-inositol hexakisphosphate phosphohydrolase) accumulated in maize (*Zeamays*) seedlings during germination. *Biochemistry Journal* 295: 413-419.
- Lambrechts, C., H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Utilization of phytate by some yeast. *Biotechnology Letters* 14: 61-66.
- Lan, G.Q., Y. W. Ho, and N. Abdullah. 2002. *Mitsuokella jalaludinii* sp. nov., from the rumens of cattle in Malaysia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 52: 713–718.
- Lay, B. W. 1994. Analisis mikroba di laboratorium. Raja Grafindo Persada, Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1988. Dasar-dasar biokimia. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Lehninger, A. L. 1995. Dasar-dasar biokimia. Penerbit Erlangga, Jakarta.
- Lei, X. G and J. M. Poress. 2003. Phytase enzymology, applications, and biotechnology. *Biotechnology Letters* 25: 1787–1794.
- Martin, J. A., R. A. Murphy, and R. F. F. Power. 2005. Purification and physico-chemical characterisation of genetically modified phytase expressed in *Aspergillus awamori*. *Bioresource Technology* 97.
- Mikio, S. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto)N-77. *Enzyme Microbiology and Technology* 56(8):1266-1269.
- Nayini, N. R. and A. M. Markakis. 1984. The phytase of yeast. *Food Science and Technology* 17: 126-132.
- Pallauf, J. and G. Rimbach. 1996. Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Archives Animal Nutrition* 50: 301-319.

- Pandey, A., G. Szakacs, C. R. Soccol, J. A. Rodriguez-Leon, and V. T. Soccol., 2001. *Bioresource Technol.* 77: 203–214.
- Pasamontes, L., M. Haiker, M. Wyss, M. Tessier, and A. P. G. M. van Loon. 1997. Gene cloning, purification and characterization of a heat stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1696–1700.
- Pelczar, M. J. Jr. dan E. C. S. Chan. 1989. *Dasar-dasar mikrobiologi*. Terjemahan R. S Hadioetomo T. Tjirosomono. UI Press, Jakarta.
- Powar, V. K. and V. Jagannathan. 1982. Purification and properties of fitate-specific phosphatase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 151: 1102-1108.
- Reddy, N. R., M. D. Pierson, S. K. Sathe, and D. K. Salunkhe. 1989. *Fitates in cereals and legumes*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- Sasramiharja, L. 1998. *Panduan pratikum mikrobiologi terapan*. Pusat Antar Universitas. Bioteknologi ITB-Bandung.
- Scott, J. J. 1991. Alkaline phytase activity in inonic detergent extracts of legume seeds. *Plant Physiology* 95 : 1298-1301.
- Selle, P. H., V. Ravindra., R. A. Cadwell, and W. L. Bryden. 2000. Phytate and Phytase: Concequences for protein utilisation. *Nutrition Reviews* : 255-278.
- Selle P. H, Ravindran V. 2006. Microbial phytase in poultry nutrition. *Animal Feed Science and Technology* <http://www.doi:10.1016/j.anifeedsci.com> diakses pada tanggal 10 Desember 2008. 14.00 WIB.
- Sequeilha, L., C. Lambrechts, H. Boze, G. Moulin, and P. Galzy. 1992. Purification and porperties of the phytase from *Schwanniomyces castelii*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 74: 7-11.
- Shah, V. and L. J. Parekh. 1990. Phytase from *Klebsiella* sp. No. PG-2: Purification and Properties. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 27: 98-102.
- Shieh, T. R., R. J. Wodzinski, and J. H. Ware. 1969. Regulation of the formation of acid phosphatase by inorganic phosphate in *Aspergillus ficuum*. *Journal of Bacteriology*. 100: 1161-1165.
- Shieh, T. R. and J. H. Ware. 1968. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase. *Applied Microbiology* 16: 1348-1351.

- Shimizu, M. 1992. Purification and characterization of phytase from *Bacillus subtilis* (natto) N-77. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 56: 1266-1269.
- Shimizu, M. 1993. Purification and characterization of phytase and acid phosphatase by *Aspergillus oryzae* K1. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 57: 1364-1365
- Simons, P.C., H.A.J. Versteegh, A. W. Jongbloed, P. A. Kemme, P. Slump, K. D Bos, M. G. E. Wolters, R. F. Beudeker, and G. J. Verschoor. 1990. Improvement of P availability by microbial phytase in broilers and pigs. *British Journal of Nutrition* 64: 525-540.
- Singh, M. and A. D. Krikorian. 1982. Inhibiton of trypsin activity *in vivo* by phytate. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 30 : 799-805.
- Steel, R. G. D. dan J. H. Torrie. 1991. Prinsip dan prosedur statistik suatu pendekatan biometrik Ed 2 Cet. 2 Alihbahasa Bambang Sumatri. PT. Gramedia Pustaka Utama, Jakarta.
- Suhartono, M. P. 1989. Enzim dan bioteknologi. PAU Bioteknologi IPB, Bogor.
- Sutardi, M. and K. A. Buckle. 1988. Characteristics of soybean phytase. *Journal of food biochemistry*. 10: 197-216.
- Tambe, S. M., G. S. Kaklij, S. M. Kelkar, And L. J Parekh. 1994. Two distinct molecular forms of phytase from *Klebsiella aerogenes*: evidence of unusually small active enzyme peptide. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 77: 23-27.
- Ullah , A. H. J. and D. M. Gibson. 1987. Extracellular phytase (E.C. 3.1. 3.8 0 from *Aspergillus ficuum* NRRL 3135 : Purification and characteristization. *Preparative Biochemistry* 17: 83-91.
- Ullah, A. H. J. 1988. *Aspergillus ficuum* phytase – partial primary structure, substrate selectivity, and kinetic characterization. *Preparative Biochemistry* 18: 459-471.
- Van der Klis, J.D., H.A.J. Versteegh, and P.C.M. Simons. 1996. Natuphos in laying hen nutrition. Pages 71-82in: BASF Technical Symposium Phosphorus and Calcium Management in layers, Atlanta, GA, January, 23, 1996.
- Volk, W. A. and M. F. Wheeler. 1993. Mikrobiologi dasar Ed 5 Cet. 2 Alih bahasa Markam. PT. Gelora Aksara Pratama, Jakarta.
- Wang, D. I. C. P. Demain, A. E. Dunhill, Humplay, and M. D. Lilly. 1979. Fermentation and enzyme technology. Jhon Willey and Sons. Inc. New York.

- Xiao-Ling, Z., W. Shen, J. Zhuge, and W. Zheng-Xiang. 2006. Biochemical properties of a thermostable phytase from *Neurospora crassa*. Federation of European Microbiological Societies and Microbiological Letter 258: 61-66.
- Yamada, K., Y. Minoda and Y. Yamamoto. 1968. Phytase from *Aspergillus terreus*. Production, purification and some general properties of the enzyme. Agricultural. Biological Chemistry 32: 1275-1282.
- Yang, W. J., Y. Matsuda, S. Sano, H. Masutani, And Nakagawa. 1991a. Purification and characterization of phytase from rat intestinal mucosa. Biochimistry and Biophysics Acta 1075: 75-82
- Yanke, L.J., H. D. Bae, L. B. Selinger, and K.-J. Cheng. 1998. Phytase activity of anaerobic ruminal bacteria. Microbiology 144: 1565-1573.
- Yoon, S. J., Y. J. Choi, H. K. Min, K. K. Cho, J. W. Kim, S. C. Lee, and Y. H. Jung. 1996. Isolation and identification of phytase-producing bacterium, *Enterobacter* sp. 4, and enzymatic properties of phytase enzyme. Enzyme Microbiology and Technology 18: 449-454.



Lampiran 1. Data Rataan Aktivitas Enzim Fitase Pada pH Yang Berbeda.

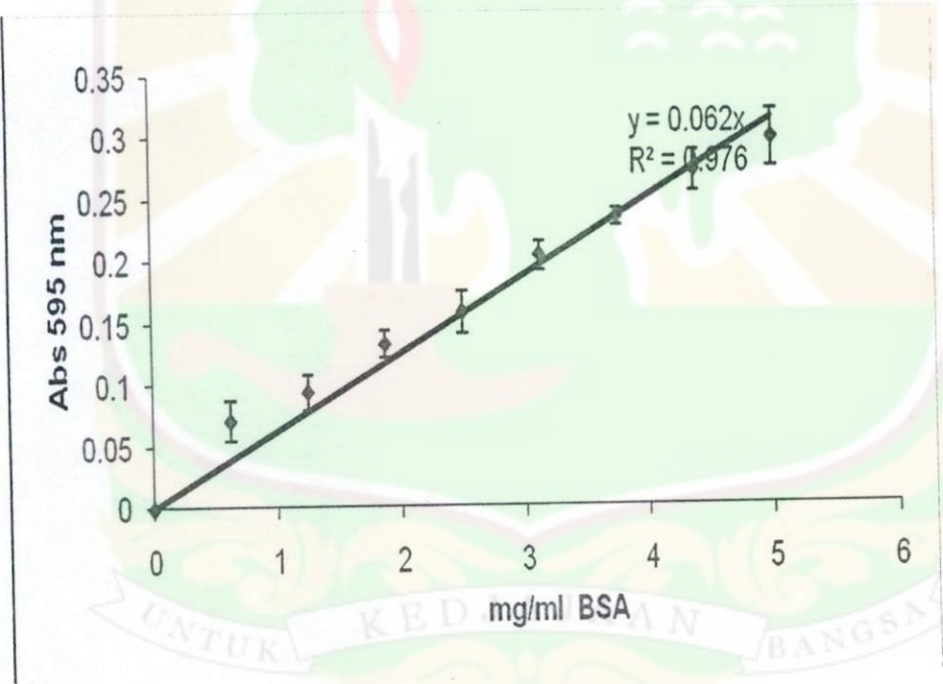
pH	Absorban			Aktivitas enzim fitase μM P/mL/menit			Total	Rataan
	Ulangan			Ulangan				
	1	2	3	1	2	3		
3	0.05	0.059	0.065	2.33	3.08	3.58	9.00	3.00
4	0.06	0.06	0.07	3.17	3.17	4.00	10.33	3.44
5	0.07	0.075	0.085	4.00	4.42	5.25	13.67	4.56
5.5	0.1	0.10	0.095	6.50	6.50	6.08	19.08	6.36
6	0.14	0.13	0.125	9.83	9.00	8.58	27.42	9.12
7	0.13	0.14	0.15	9.00	9.83	10.67	29.50	9.83
7.5	0.13	0.13	0.125	9.00	9.00	8.58	26.58	8.86
8	0.12	0.11	0.125	8.17	7.33	8.58	24.08	8.03
8.5	0.12	0.11	0.12	8.17	7.33	8.12	23.67	7.89
9	0.11	0.10	0.11	7.33	6.50	7.33	21.12	7.06
10	0.11	0.10	0.10	7.33	6.50	6.50	20.33	6.78
Total							224.79	
Rataan								6.81313

Lampiran 2. Data Rataan Aktivitas Enzim Fitase Pada Temperatur Yang Berbeda.

Temperatur	Absorban			Aktivitas enzim fitase μM P/mL/menit			Total	Rataan
	Ulangan			Ulangan				
	1	2	3	1	2	3		
30	0.24	0.24	0.23	18.17	18.17	17.33	53.67	17.89
40	0.25	0.245	0.26	19.00	18.58	19.83	57.42	19.14
50	0.265	0.265	0.26	20.25	20.25	19.83	60.33	20.11
60	0.28	0.28	0.295	21.50	21.50	22.75	65.75	21.92
70	0.29	0.29	0.30	22.33	22.33	23.17	67.83	22.61
80	0.31	0.30	0.32	24.00	23.17	24.83	72.00	24.00
90	0.31	0.32	0.34	24.00	24.83	26.50	75.33	25.11
100	0.27	0.26	0.25	20.67	19.83	19.00	59.50	19.83
Total							511.508	
Rataan								21.32639

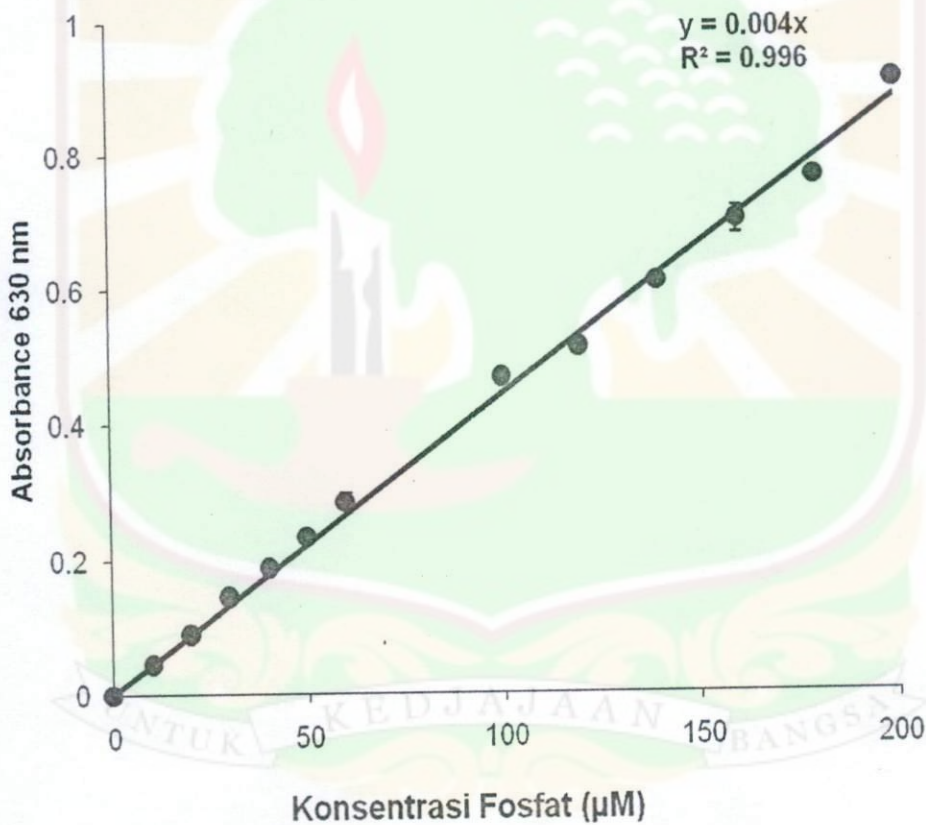
Lampiran 3. Kurva Standar BSA

BSA mg/ml	Absorbans(595 nm)			blank			Rataan
	Ulangan			Ulangan			
	1	2	3	1	2	3	
0	0.023	0.003	0.024	0	0	0	0
0.625	0.081	0.092	0.09	0.058	0.089	0.066	0.071
1.25	0.116	0.112	0.104	0.093	0.109	0.08	0.094
1.875	0.16	0.143	0.144	0.137	0.14	0.12	0.132333
2.5	0.191	0.171	0.162	0.168	0.168	0.138	0.158
3.125	0.214	0.217	0.229	0.191	0.214	0.205	0.203333
3.75	0.265	0.231	0.256	0.242	0.228	0.232	0.234
4.375	0.302	0.285	0.276	0.279	0.282	0.252	0.271
5	0.345	0.296	0.299	0.322	0.293	0.275	0.296667



Lampiran 4. Kurva Standar Fosfat

Kosentrasi Phospat	Ulangan data Absorban 630 nm			Jumlah	Rataan
	1	2	3		
0					
10	0.04	0.041	0.05	0.131	0.0437
20	0.085	0.090	0.09	0.265	0.0883
30	0.14	0.14	0.149	0.429	0.143
40	0.18	0.19	0.19	0.56	0.187
50	0.23	0.231	0.24	0.701	0.2337
60	0.28	0.285	0.29	0.855	0.285
100	0.46	0.46	0.48	1.4	0.467
120	0.505	0.51	0.52	1.535	0.5117
140	0.61	0.61	0.61	1.83	0.61
160	0.7	0.7	0.7	2.1	0.71
180	0.75	0.76	0.79	2.3	0.767
200	0.80	0.8		1.6	0.8



Lampiran 5. Data pellet disonikasi

Perlakuan	Absorban			Aktivitas enzim μM P/mL/menit			Total	Rataan
	Ulangan			Ulangan				
	1	2	3	1	2	3		
Membran sel	0.028	0.03	0.035	0.6667	1.08	0.222	1.97	0.66
Fraksi Sitosol	0.002	0.0015	0.0015	-1.708	-1.71	-0.57	-3.99	-1.3

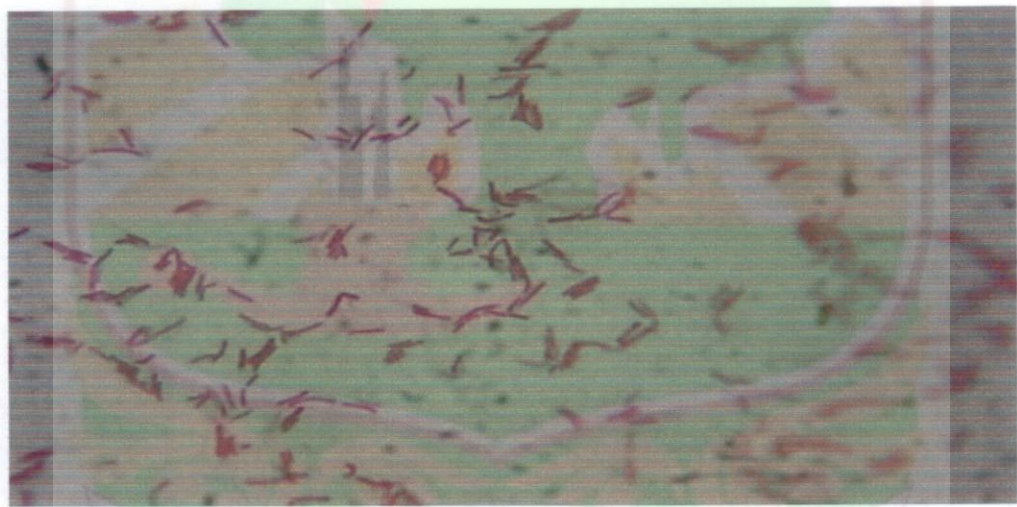
Lampiran 6. Data Aktivitas Enzim Fitase Dari Isolat N1, N3, dan N4 Selama 5 hari

Isolat	Absorban					Aktivitas enzim P (μM)/1 mL enzim/min				
	Hari					Hari				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
N1	-0.01	0.07	0.32	0.37	0.36	0	4	24.83	29	28.16
	-0.02	0.12	0.32	0.37	0.37	0	8.16	24.83	29	29
	0.02	0.07	0.34	0.38	0.34	-0.17	4	26.5	29.83	26.5
Rataan						-0.06	5.38	25.39	29.27	27.88
N3	0.07	0.24	0.32	0.38	0.35	4	18.16	22.58	29.83	27.33
	0.12	0.21	0.34	0.39	0.39	8.167	15.66	24.09	30.66	30.66
	0.08	0.27	0.35	0.4	0.37	4.833	20.66	24.85	31.5	29
Rataan						5.667	18.16	23.84	30.66	29
N4						0	16.5	33.17	40.66	37.33
	-0.03	0.22	0.42	0.51	0.47	-1	20.66	30.67	37.33	37.33
	0.01	0.27	0.39	0.47	0.47	-0.17	20.66	29	41.5	41.5
Rataan	0.02	0.27	0.37	0.52	0.52	-0.39	19.27	30.94	39.83	38.72

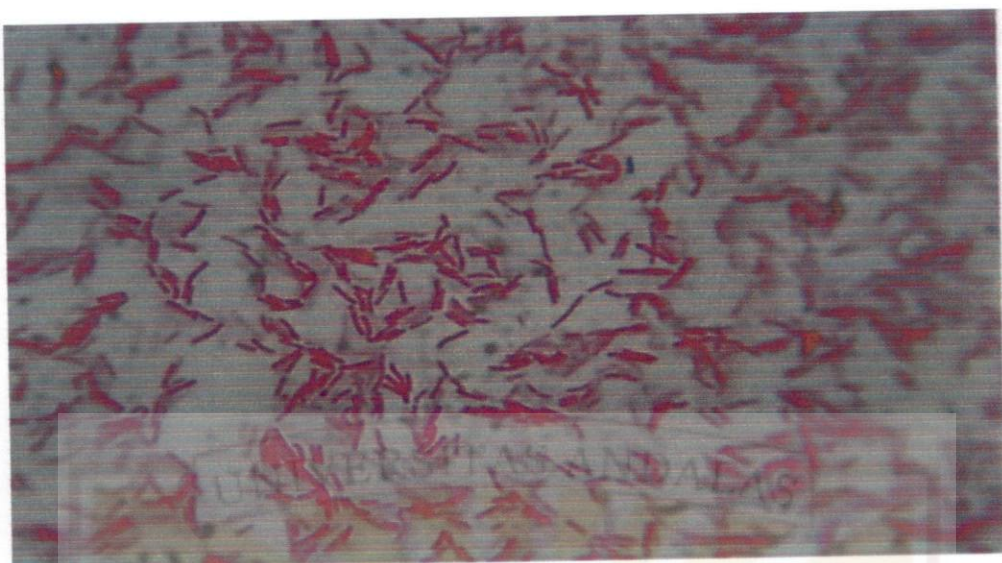
Lampiran 7. Data dan Rataan Stabilitas Aktivitas Enzim Fitase

Temperatur	Absorban			% Aktivitas enzim fitase			Total	Rataan
	Ulangan			Ulangan				
	1	2	3	1	2	3		
30	0.2	0.2	0.24	100	100	100	300	100
40	0.23	0.26	0.25	116.85	133.70	104.58	355.14	118.38
50	0.26	0.26	0.27	133.70	133.70	113.76	381.17	127.05
60	0.27	0.3	0.3	139.32	116.80	127.52	383.65	127.88
70	0.29	0.31	0.33	150.56	161.79	110.79	423.15	141.05
80	0.32	0.32	0.33	167.41	167.41	141.28	476.11	158.70
90	0.35	0.34	0.35	184.26	178.65	150.45	513.38	171.12
100	0.31	0.29	0.3	161.79	150.56	127.52	439.88	146.62

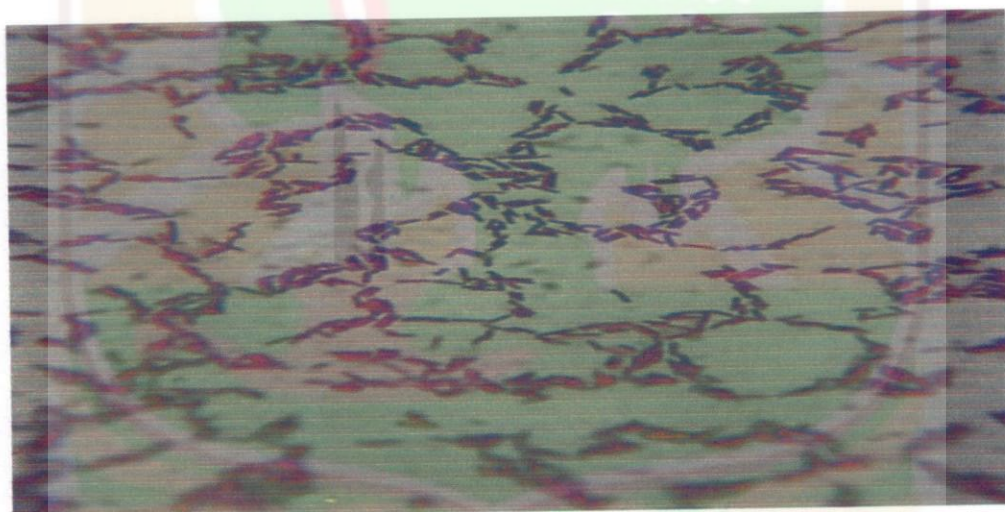
Lampiran 8. Foto-foto Pewarnan Gram dan Pewarnaan Spora Bakteri Isolate N1, N3 dan N4



Bakteri Isolat N1 gram-negatif

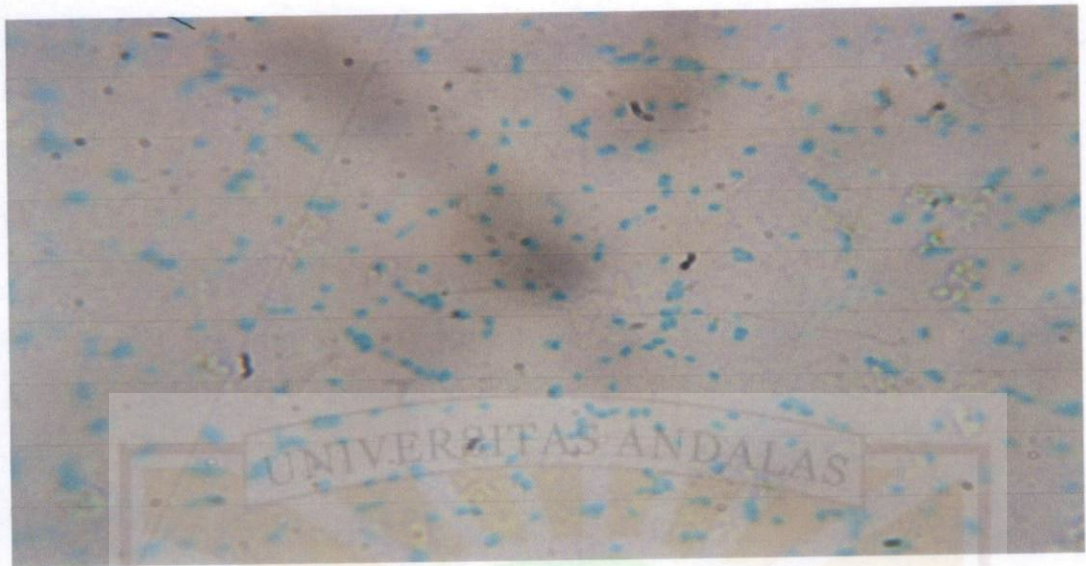


Bakteri Isolate N3 gram-negatif



Bakteri isolat N4 gram-positif





UNIVERSITAS ANDALAS

Bakteri Isolate N4 Berspora

